

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. M. K. Schilling
Doktorvater: PD Dr. med. O. Kollmar

Einfluss von Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-2 auf extrahepatisches Tumorwachstum kolorektaler Metastasen nach Leberresektion

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2011

vorgelegt von: Bastian Junker

geb. am: 09.04.1980 in Saarbrücken/Saar

Dekan: Prof. Dr. med. M. D. Menger

Gutachter: 1.
2.
3.

Datum der Promotion:

Inhaltsverzeichnis

| Kapitel | Seitenzahl |
|---|------------|
| 1. Zusammenfassung | 1 |
| 1.1. Zusammenfassung | 1 |
| 1.2. Abstract | 2 |
| 2. Einleitung | 3 |
| 2.1. Das kolorektale Karzinom | 3 |
| 2.2. Tumorprogression und Metastasierung | 4 |
| 2.3. Leberresektion und –regeneration | 4 |
| 2.4. Einfluss der Leberregeneration auf Tumorzellen | 6 |
| 2.5. Chemokine | 7 |
| 2.6. Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-2 | 9 |
| 2.7. Zielsetzung | 9 |
| 3. Material und Methoden | 10 |
| 3.1. Versuchstiere und Tierhaltung | 10 |
| 3.2. Narkose | 10 |
| 3.3. Rückenhautkammer | 11 |
| 3.4. Tumorapplikation | 12 |
| 3.5. Versuchsreihe exogenes MIP-2 - topisch | 13 |
| 3.6. Versuchsreihe endogenes MIP-2 - Leberresektion | 13 |
| 3.7. Mikroskopie | 15 |
| 3.8. Auswertung der Intravitalmikroskopie | 16 |
| 3.9. Versuchsende und Entnahme von Gewebeproben | 17 |
| 3.10. Erstellung histologischer Präparate | 17 |
| 3.11. Auswertung der histologischen Schnitte | 18 |
| 3.12. Statistische Auswertung | 19 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4. | Ergebnisse | 20 |
| 4.1. | exogenes MIP-2 | 20 |
| 4.1.1. | Tumorstadium | 20 |
| 4.1.2. | Tumorstadium | 20 |
| 4.1.3. | Tumorstadium | 24 |
| 4.1.4. | Tumorstadium, -apoptose und CXCR2 Expression | 24 |
| 4.2. | endogenes MIP-2 - Leberresektion | 27 |
| 4.2.1. | Tumorstadium | 27 |
| 4.2.2. | Tumorstadium | 30 |
| 4.2.3. | Tumorstadium | 33 |
| 4.2.4. | Tumorstadium, -apoptose und CXCR2- Expression | 33 |
| 5. | Diskussion | 36 |
| 5.1. | Relevanz der Tierversuche und des Tumormodells in der Maus | 36 |
| 5.2. | MIP-2 - Wachstum etablierter extrahepatischer Tumoren | 37 |
| 5.3. | MIP-2 - Wachstum extrahepatischer Tumoren nach Leberresektion | 40 |
| 5.4. | Schlussfolgerung | 43 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 44 |
| 7. | Danksagung/ Publikationen | 54 |

1. Zusammenfassung

1.1. Zusammenfassung

Im Rahmen der Behandlung von Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms stellt die chirurgische Resektion das einzige kurative Verfahren dar. Während der Regeneration nach Leberresektion kommt es zur Ausschüttung verschiedener Wachstumsfaktoren und Chemokine. Deren Einfluss auf die Neubildung und das Wachstum extrahepatischer Metastasen ist bisher nicht erforscht. In der vorliegenden Arbeit wird anhand eines etablierten murinen Modells einer extrahepatisch gewachsenen kolorektalen Metaste der Einfluss von Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-2 auf das Wachstum, die Angiogenese, Tumorzellproliferation, -apoptose und CXCR-2 Expression untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass MIP-2 die CXCR2 Expression in den Tumoren verstärkt und die Tumorzellproliferation fördert und somit das Tumorstadium verglichen zur Kontrollgruppe signifikant steigert. Interessanterweise ging dieses gesteigerte Tumorstadium nicht mit einer vermehrten Angiogenese und VEGF Expression einher. Nach Leberresektion führte die funktionelle Inhibition von MIP-2 zu einem verzögerten extrahepatischen Anwachsen der Tumorzellen, das Wachstum bereits etablierter Tumoren wurde hingegen nicht beeinflusst. Diese initiale Wachstumsverzögerung ging kompensatorisch mit einer Stimulation der Angiogenese und Tumorzellmigration verglichen zur Kontrollgruppe einher. Desweiteren kam es durch die initiale MIP-2 Blockade zu einer signifikanten Reduktion der CXCR2 Expression und der Tumorzellapoptose.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig in einem Mausmodell gezeigt werden, dass MIP-2 das Wachstum etablierter extrahepatischer Kolonkarzinommetastasen beschleunigt und die Neutralisierung von MIP-2 das Anwachsen von Tumorzellen hemmt. Der MIP-2/CXCR2 Signalweg ist somit ein erfolgsversprechendes Ziel für eine frühe anti-Tumor-Therapie von Patienten, die sich einer Leberresektion unterziehen, um frühe Rezidive zu verhindern.

1.2. Abstract

Hepatic resection is the only curative option for patients with hepatic metastases from colorectal cancer. During post operative liver regeneration multiple growth factors and chemokins are released. There is no information on how liver resection-associated chemokins influences engraftment and growth of colorectal cancer cells at extrahepatic sites. With the use of an established murine extrahepatic colon cancer metastasis model, this work analyzed how Macrophage inflammatory Protein (MIP)-2 affects growth, angiogenesis, tumor cell proliferation, tumor cell apoptosis and CXCR-2 expression. The result of the present study demonstrates that MIP-2 induced a marked CXCR-2 expression and promoted a distinct tumor cell proliferation. This was associated with a significant increase of tumor size compared to controls. Of interest, the increased tumor growth was not associated with an increased angiogenesis and VEGF- activity. After liver resection, functional inhibition of MIP-2 significantly delayed extrahepatic tumor cell engraftment but not the growth of established metastases. The initial delay of engraftment was associated with a compensatory stimulation of vascularisation and tumor cell migration when compared to controls. Further, initial anti-MIP-2 treatment was associated with a significant reduction of CXCR-2 expression and tumor cell apoptosis.

For the first time, this work shows in a murine tumor model, that MIP-2 accelerates the growth of established extrahepatic colorectal metastasis and neutralisation of MIP-2 delayed engraftment. Therefore, the MIP-2/CXCR-2 signaling pathway may be a promising target for early antitumor therapy in patients undergoing liver resection to prevent early relapse.

2. Einleitung

2.1 Das kolorektale Karzinom

Krebs und die dadurch verursachten Todesfälle nehmen in unserer Gesellschaft eine exponierte Stellung in der Todesursachenstatistik ein. In den Vereinigten Staaten sind ein viertel aller Todesfälle krebsbedingt (Jemal A et al., 2009). Direkt nach Herz- Kreislauferkrankungen sind Krebserkrankungen in Deutschland die zweithäufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt, 2008).

Im Jahre 2008 veröffentlichte das Robert Koch Institut in Zusammenarbeit mit der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland für 2003/2004 aktuelle Häufigkeiten und Trends bezüglich der Krebserkrankungen in Deutschland (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2008). Hiernach liegt die Zahl der jährlich auftretenden Neuerkrankungen um ein vielfaches höher als die der eingangs erwähnten Todesfälle. Nach offiziellen Schätzungen treten jedes Jahr ca. 230500 Neuerkrankungen von Krebs bei Männern und ca. 206000 bei Frauen auf. Unter diesen nimmt das kolorektale Karzinom mit 16,2% der Neuerkrankungen bei Männern und 17,5% bei Frauen jeweils die zweite Position in Deutschland ein. Häufiger sind bei beiden Geschlechtern nur die Neuerkrankungen an geschlechtsspezifischen Tumoren, bei Männern das Prostatakarzinom mit 25,4% Neuerkrankungen und bei Frauen das Karzinom der Brustdrüse mit 27,8% neu aufgetretenen Erkrankungsfällen. Auch bei den krebsbedingten Todesfällen steht das kolorektale Karzinom jeweils an zweiter Stelle. Während bei den Frauen auch hier das Karzinom der Brustdrüse die Spitzenposition mit 17,9% Todesfällen vor dem kolorektalen Karzinom (14,3%) einnimmt, ist bei den Männern das Bronchial-Karzinom die häufigste Ursache für krebsbedingte Todesfälle (26,0%) gegenüber dem kolorektalen Karzinom mit 12,4% an Todesfällen. Bei einer mittels Periodenanalyse durchgeführten Analyse von Daten der Jahre 2000 bis 2004 wurde für das gesamte Spektrum der Krebserkrankungen bei Frauen eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von 60 %, bei Männern von 53 % festgestellt. Hierbei liegt das kolorektale Karzinom mit kumulierten relativen 5-Jahres-Überlebensraten für Männer wie auch für Frauen von 60 % im Durchschnitt. Die schlechtesten Prognosen haben die Krebserkrankungen des Pankreas. Betrachtet man jedoch die Dimensionen, so ist das Pankreaskarzinom mit etwa jeweils 6500 Neuerkrankungen und fast genauso

hoher Todesrate jedoch nur für halb so viele Todesfälle verantwortlich wie das kolorektale Karzinom.

2.2 Tumorprogression und Metastasierung

Für die meisten Todesfälle sind nicht die Primärgeschwülste die Hauptursache, sondern die Metastasen (Abdalla EK et al., 2004; Fong Y et al., 1999). Auch bei der Behandlung von neoplastischen Erkrankungen stellen sie in vielen Fällen das größere Problem dar. Käme es nicht zum metastatischen Abwandern über die Lymph- oder die Blutbahn und dem damit verbundenen metastatischen Wachstum von Sekundärtumoren, so wäre ein Patient nach Entfernung des Primärtumors geheilt. Es gibt Tumoren, welche früh metastasieren und welche, die überhaupt keine Streuung von Tumorzellen verursachen. Jeder metastasierende Tumor hat seinen bevorzugten Metastasierungsweg, sowie bevorzugte Organe, in die er streut.

Das in dieser Arbeit betrachtete kolorektale Karzinom breitet sich in der Regel per continuitatem durch die Darmwand in das parakolische Fettgewebe oder Nachbarorgane aus. Es streut lymphogen in die regionären Lymphknoten und hämatogen überwiegend über den venösen Abfluss in die V. portae. Damit stellt die Leber das primäre Metastasierungsorgan dar. Etwa die Hälfte der Patienten mit der Diagnose kolorektales Karzinom entwickeln im Laufe ihrer Krankheit Lebermetastasen (Steele G et al., 1989). Diese Lebermetastasen sind in den meisten Fällen die Todesursache der Patienten, nicht der Primärtumor (Fong Y et al., 1999; Abdalla EK et al., 2004). Neben der Leber sind die Lungen und auch das knöcherne Skelett weitere typische Metastasierungsorgane des kolorektalen Karzinoms.

Außer der Behandlung des Primärtumors stellt die Behandlung der Metastasen ein wichtiges Ziel der Tumorthherapie dar. Übertragen auf das hierbei verwendete Modell ist die Therapie der Lebermetastasen häufig als entscheidend für den Behandlungserfolg eines kolorektalen Karzinoms zu betrachten.

2.3 Leberresektion und -regeneration

Die Resektion von kolorektalen Lebermetastasen ist der Goldstandard in der Therapie mit dem einzigen kurativen Ansatz. Die 5- Jahres- Überlebensrate beträgt hierbei bis zu 58%. (Abdalla EK et al., 2004; Choti MA et al., 2002; Yamamoto J et

al., 1999; Fong Y et al., 1999). Die chirurgische R0- Resektion (kurative Leberresektion mit kompletter Entfernung des Tumors) ist bei Patienten mit isolierten Lebermetastasen die einzige Behandlungsmethode mit erwiesenem Langzeitüberleben (Abdalla EK et al., 2006). Lange Zeit wurden extrahepatische Metastasen als Kontraindikation für eine Leberresektion betrachtet. In den letzten Jahren wurden aber in diesem Patientenkollektiv 5- Jahres- Überlebensraten nach Leberresektion und vorhandener extrahepatischer kolorektaler Metastasen in Lunge, Gehirn, Knochen und anderen Lokalisationen bis hin zu 30% berichtet (Elias D et al., 2005; Labow DM et al., 2002; Yoshidome H et al., 2004). Übereinstimmend damit zeigten Elias et al., dass die komplette Resektion aller Metastasen des kolorektalen Karzinoms wichtiger für das allgemeine Patientenüberleben ist als die Lokalisation und die Anzahl der Metastasen (Elias D et al., 2005). Und Carpizo et al. sehen in extrahepatischen Metastasen keine absolute Kontraindikation für eine Leberresektion (Carpizo DR et al., 2009). Ein weiterer Fortschritt der letzten Jahre war die Kombination mit präoperativer Chemotherapie. Dank dieser gelang es bei 15-30% der Patienten, welche initial als anatomisch irresektabel galten, eine komplette Resektion nach präoperativer Chemotherapie durchzuführen und damit 5-Jahres-Überlebensraten von 30-35% zu erreichen (Abdalla EK et al., 2006). Der Unterschied in den 5-Jahres-Überlebensraten zwischen primär resektablen Lebermetastasen und solchen, die primär nicht resektabel waren und einer neoadjuvanten Chemotherapie unterzogen werden mussten, zeigten Adam et al. Hierbei steht eine 5-Jahres-Überlebensrate von 48% bei primär resektablen Tumoren einer Überlebensrate von 33% bei neoadjuvant behandelten Tumoren gegenüber (Adam R et al., 2004).

Nach der Leberresektion kommt es innerhalb kurzer Zeit zu einer Regeneration des Leberparenchyms. An diesem Prozess sind neben Hepatozyten auch eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen beteiligt (Michalopoulos GK et al, 1997; Christophi C et al., 2008). Neben der parenchymalen Lebergeweberegeneration stimuliert die Leberresektion jedoch auch das Tumorwachstum in der erhalten gebliebenen Leber (Kollmar O et al., 2006[A]; Drixler TA et al., 2000; Delman KA et al., 2002). Die Größe der Wachstumsstimulation des Tumors wird als proportional zur Größe des resezierten Lebergewebes angesehen (Mizutani J et al., 1992; Slooter GD et al., 1995; Picardo A et al., 1998). Des Weiteren entwickelten 20% der Patienten nach Leberresektion Metastasen in der

Lunge und 2 bis 5% Metastasen in Gehirn, Knochen oder anderen Lokalisationen (Labow DM et al., 2002; Yoshidome H et al., 2004).

2.4 Einfluss der Leberregeneration auf Tumorzellen

Der Einfluss der Leberregeneration auf das Wachstum von Tumoren und Metastasen ist noch nicht eindeutig geklärt. Rupertus et al. zeigten, dass der Einfluss der Leberregeneration auf das Tumorwachstum von extrahepatisch wachsenden kolorektalen Karzinomen vom Ausmaß des vorher resezierten Lebergewebes abhängig ist. Während eine Resektion von 30% des ursprünglichen Lebergewebes zu keiner Steigerung des extrahepatischen Tumorwachstums führte, konnte bei einer 70%igen Resektion eine vermehrte Neovaskularisation, gesteigerte Migrationszahlen sowie ein schnelleres Anwachsen der extrahepatisch implantierten Tumorzellen beobachtet werden. Dies führte zu einer deutlich vergrößerten Tumorfläche (Rupertus K et al., 2007). Diese Ergebnisse decken sich sowohl mit denen von Schindel et al., die zeigen konnten, dass eine Teilresektion der Leber zu einem schnelleren Anwachsen von subkutan implantierten Zellen eines hepatozellulären Karzinoms führt (Schindel DT et al., 1997), als auch mit der Arbeit von Slooter et al., die den Grad der Leberresektion proportional zur Tumorstimulation und der Häufigkeit von extrahepatischen Metastasen setzten (Slooter GD et al., 1995). Demgegenüber stehen Ergebnisse von Forschungsgruppen, die einen Rückgang von extrahepatisch implantierten Hepatoma- Zellen nach einer Leberteilresektion beobachtet haben (Ono M et al., 1986; Picardo A et al., 1998). De Jong et al. zeigten einen Zusammenhang zwischen der Lokalisation der metastatischen Veränderung und deren Reaktion auf die durchgeführte Leberresektion. Während metastatische Absiedlungen in der verbleibenden Leber durch die Teilresektion einen Wachstumsschub erfuhren, zeigte diese auf metastatische Absiedlungen subkapsulär in der Niere und im retroperitonealen Raum keinen Effekt (De Jong KP et al., 1995).

Ein weiterer bisher noch nicht geklärter Faktor ist die Frage nach der Ursache für den Wachstumsanreiz auf die metastatischen Absiedlungen nach einer Leberresektion. Ein Ansatz ist der Wegfall einer inhibierenden Komponente, die vom Primärtumor ausgeht und die Angiogenese und damit das Wachstum von Metastasen unterdrückt. Fällt nach Entfernung des Primärtumors diese Inhibition weg, so kommt es zu einer Steigerung der Vaskularisation sowie zu einer Beschleunigung des Wachstums der

Metastasen (Sckell A et. al., 1998; Peeters CF et al., 2004). Eine Erklärung für die Ergebnisse der eingangs erwähnten Arbeit von Rupertus et al. ist dies jedoch nicht, da in dieser Arbeit kein Primärtumor vorhanden war. Das verstärkte Wachstum der extrahepatischen Metastasen muss daher auf den Prozess der Leberregeneration nach Leberresektion zurückzuführen sein. Zu diesem Schluss kamen auch Christophi et al., die die für die Leberregeneration verantwortlichen Wachstumsfaktoren und Cytokine als jene Schlüsselprozesse betrachteten, die am Tumorwachstum und an der Metastasenbildung beteiligt sind (Christophi C et al., 2008).

2.5 Chemokine

Das Tumorwachstum hängt stark von der Angiogenese, der Ausbildung neuer Blutgefäße, ab (Folkman J, 2001, Hanahan D et al., 2000). Die Angiogenese und die neu entwickelten Blutgefäße sind elementar für die ausreichende Geweboxigenierung und den Nährstoffbedarf. Ohne Angiogenese entwickeln Tumoren weder eine klinisch relevante Größe noch metastasieren sie hämatogen in andere Organe (Folkman J, 1971 und 1995). Früh in der Tumorentwicklung wird die Angiogenese gestartet. Eine klassische Vorstellung der Tumorangiogenese geht von einem „Waagen- Modell“ aus, wobei auf der einen Seite die pro-angiogenen Faktoren und auf der anderen die anti-angiogenen Faktoren sind. Wann es zum Start der Angiogenese kommt hängt davon ab, wie stark die Balance sich in Richtung der pro-angiogenen Faktoren verschiebt. Auslöser dieser Verschiebung in Richtung pro-Angiogenese sind physiologische Stimuli wie metabolischer Stress (z.B. Hypoxie), mechanischer Stress (der durch die vermehrte Gewebsmasse entsteht), immunologische Antworten, aber auch genetische Mutationen (z.B. Onkogen-Aktivierung oder Tumor-Suppressor-Mutationen) (Kerbel RS, 2000; Carmeliet P, 1999). Die Angiogenese kann deshalb zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorprogression stattfinden und hängt von der Natur des Tumors und dem „Mikroenvironment“ ab (Bergers G et al., 2003). Historisch unterteilte man die tumorassoziierte Angiogenese in zwei Phasen. Die erste ist eine avaskuläre Phase, in der kleine okkulte Läsionen von nicht mehr als 1-2 mm Durchmesser auftreten. Durch ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose bleiben diese Läsionen schlafend. Viele dieser schlafenden Tumoren konnte man bei Autopsien nicht krebsbedingter Todesfälle finden (Black WC et al., 1993). Dies unterstützt die These,

dass nur sehr wenige der schlafenden Tumoren in die zweite, die vaskuläre Phase, eintreten, in der der Tumor dann exponentiell wächst. Dieser Zeitpunkt, der Übergang von avaskulärer zu vaskulärer Phase, der Start der Angiogenese, wird als angiogenic switch bezeichnet (Hanahan D et al., 1996) und ist charakterisiert durch die Onkogen-gesteuerte Ausschüttung von pro-angiogenen Proteinen durch den Tumor (Rak J et al., 2000). Zu diesen pro-angiogenen Proteinen zählen vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), interleukin-8 (IL-8), placenta-like growth factor (PLGF), transforming growth factor- β (TGF- β), platelet derived endothelial growth factor (PD-EGF), pleiotrophin und andere (Relf M et al., 1997; Carmeliet P et al., 1998; Fukumura D et al., 1998). Diese pro-angiogenen, aber auch die anti-angiogenen Faktoren werden von Tumorzellen, Endothelzellen, Stromazellen, dem Blut und dem Bindegewebe freigesetzt (Fukumura D et al., 1998).

Als eines der bedeutenden Chemokine beim Tumorwachstum und der Metastasierung wird IL-8 betrachtet. Studien belegen, dass die gesteigerte IL-8 Expression bestimmter Tumorzelllinien in vitro stark mit erhöhtem Wachstum und dem metastatischen Potential korreliert (Ueda T et al., 1997;). IL-8 scheint die Tumorzellbeweglichkeit und -migration zu stimulieren (Xie K, 2001; Miller LJ et al., 1998) und als ein autokriner Wachstumsfaktor für die Tumorzellproliferation zu agieren (Brew R et al, 2000). Außerdem wurde IL-8 als ein möglicher Auslöser der Angiogenese angesehen (Takeda A et al., 2002). Diese Ansicht basiert auf Studien, die eine signifikante Korrelation zwischen der Tumorgefäßdichte und dem IL-8-Level (Haraguchi M et al., 2002), sowie eine Inhibition der Tumorangiogenese durch Neutralisation von IL-8 zeigten (Strieter RM et al., 1995; Arenberg DA et al, 1996; Huang S et al., 2002).

Die biologische Relevanz und die Rolle der IL-8-Expression bei der Tumorprogression und -metastasierung werden noch immer diskutiert (Ueda T et al., 1994; Xie K, 2001). Einige metastasierende Tumorzelllinien produzieren kein IL-8 (Balbay MD et al., 1999), bei anderen fehlt die Korrelation zwischen dem Maß der IL-8 Expression und dem tumorösen und metastatischen Potential (Xie K, 2001). Beim kolorektalen Karzinom, sind die Serumlevel von IL-8 bei Patienten mit Lebermetastasen signifikant höher als bei denen ohne Metastasen (Ueda T et al., 1994, Ueda T et al., 2000).

2.6 Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-2

Das murine (mausspezifische) CXC-Chemokin Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-2 ist ein funktionales Analogon des menschlichen IL-8 (Oppenheim JJ et al., 1991; Ness TL et al., 2003; Mosher B et al., 2001; Wang J et al., 1997; Saijo Y et al., 2002; Schramm R et al., 2000). Im Allgemeinen sind Makrophagen, sowie auch Granulozyten, Monozyten, Endothelialzellen und Fibroblasten in der Lage auf einen Stimulationsreiz hin MIP-2 zu produzieren (Xing Z et al., 1994; Armstrong DA et al., 2004; Otto VI et al., 2000). MIP-2 wird neben anderen Tumorarten vom kolorektalen Karzinom exprimiert (Homey B et al., 2002). Vergleichbar mit IL-8 agiert MIP-2 als Botenstoff für Neutrophile, ist an der Wundheilung beteiligt (Fahey TJ et al., 1990) und verursacht Entzündungen (Schramm R et al., 2004).

Kollmar et al. konnten in vorhergehenden experimentellen Studien zeigen, dass MIP-2 das Anwachsen von CXCR2 expremierenden kolorektalen Lebermetastasen begünstigt (Kollmar O et al., 2006[B]). Eine durch die Leberresektion induzierte Beschleunigung des Anwachsens intrahepatischer Metastasen konnte durch eine Blockade von MIP-2 signifikant verringert werden (Kollmar O et al., 2006[A]).

2.7 Zielsetzung

Kollmar O et al. konnten sowohl den Einfluss von exogenem MIP-2 sowie von endogenem MIP-2, freigesetzt nach Leberresektion, auf intrahepatische Metastasenbildung beschreiben (Kollmar O et al., 2006[A, B]). In der bisherigen Literatur gibt es bisher keine Informationen, inwieweit die Ausschüttung von MIP-2 nach Leberresektion auch das Anwachsen kolorektaler Tumorzellen in extrahepatischem Gewebe begünstigt. Außerdem wurde der Effekt von MIP-2 auf bereits etablierte Metastasen bisher nicht untersucht. Unter Zuhilfenahme eines etablierten Modells extrahepatischer, kolorektaler Krebsmetastasen bei Mäusen wurde in der vorliegenden Arbeit deshalb untersucht, inwieweit die Ausschüttung von MIP-2 nach Leberresektion das Anwachsen extrahepatischer Tumorzellen beeinflusst und ob MIP-2 auch stimulierend auf das Wachstum bereits etablierter Tumoren wirkt.

3. Material und Methoden

Diese Arbeit bestand aus zwei Versuchsreihen. Die erste Versuchsreihe beschäftigte sich mit der Wirkung von MIP-2 auf das Wachstum etablierter extrahepatischer Metastasen, wobei exogen MIP-2 zugeführt wurde. In der zweiten Versuchsreihe wurde die Wirkung von endogenem MIP-2 auf das Anwachsen extrahepatischer Metastasen nach Leberresektion erforscht, indem zuerst eine Leberresektion durchgeführt und dann das endogen ausgeschüttete MIP-2 durch Antikörperinjektionen zu verschiedenen Zeitpunkten gehemmt wurde.

3.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Für die Versuche wurden weibliche BALB/c-Mäuse (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Versuchstiere wurden einige Tage vor dem Versuchsbeginn aus Sulzfeld angeliefert und in der Tierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universitätskliniken des Saarlandes, 66421 Homburg/Saar (Tierschutzbeauftragte Frau Dr. med. vet. M. Frings) unter standardisierten und klimatisierten Bedingungen (Lufttemperatur: 22-24°C, relative Luftfeuchtigkeit: 60-65%, Tag/Nachtrhythmus: 12h/12h) in Einzelkäfigen gehalten. Während ihrer Haltung bekamen die Versuchstiere Standard-Laborfutter (Altromin 1324, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und Wasser ad libitum. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn 12-16 Wochen alt und ihr Körpergewicht (KG) betrug 16-23g.

3.2. Narkose

Zur Präparation der Rückenhautkammer sowie zur sich wiederholenden Intravitalmikroskopie wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von 10 ml/kg KG eines Narkosegemisches bestehend aus 8,25 ml isotonischer NaCl-Lösung (Braun, Melsungen, Deutschland), 1ml Rompun 2%® (Xylazinhydrochlorid, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) und 0,75 ml Ketavet® (Ketaminhydrochlorid, Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) pro 10 ml anästhesiert. Dieses Narkosegemisch bot eine schnelle, etwa 30-40 min anhaltende Anästhesie mit gleichzeitiger Analgesie und Muskelrelaxierung. Bei Bedarf wurde für die weitere Unterhaltung der Narkose 0,05 bis 0,07 ml dieses Narkosegemisches verwendet.

3.3. Rückenhautkammer

Nach Sicherstellung der ausreichenden Anflutung der Narkose wurde der Rücken des Tieres rasiert, mit PilcaMed® (ASID Bonz, Böblingen, Deutschland) Enthaarungscreme vollständig enthaart (Abbildung 1A) und dann Reste der Enthaarungscreme unter lauwarmen Wasser abgespült. Vor Beginn der Operation erfolgte eine Desinfektion mit Softasept® (Braun, Melsungen, Deutschland). Unter Gegenlichtkontrolle mit Hilfe einer Kaltlichtquelle wurde die Rückenhaut des Tieres angehoben und so justiert, dass die symmetrisch angelegten Hautgefäße beider Seiten zur Deckung kamen. Nun wurde die Maus über die so entstandene Hautduplikatur mit zwei Haltefäden an einer Querstange befestigt. Der hintere Kammerrahmen wurde anschließend durch zwei U-Nähte fixiert und zwei Inzisionen für den Durchtritt der Schrauben angefertigt. Dann wurde immer noch unter Gegenlichtkontrolle der Bereich des späteren Beobachtungsfensters markiert (Abbildung 1B). Die Tiere wurden umgelagert und mit Hilfe mikrochirurgischer Instrumente sowie eines Operationsmikroskopes (Leica, Bensheim, Deutschland) die Hautschicht innerhalb der Markierung bis auf die Schicht der quergestreiften Muskulatur abpräpariert (Abbildung 1C). Um eine Schädigung des Gewebes durch Austrocknung zu verhindern wurde die Wunde während der Präparation regelmäßig mit isotoner Kochsalzlösung (Braun, Melsungen, Deutschland) gespült. Nach einer abschließenden Spülung wurde der zweite Kammerrahmen aufgebracht und durch Schraubenmuttern befestigt. Als letzter Schritt wurde nun auf die vordere Kammerhälfte ein Deckglas aufgebracht und mit einem Kupfersprengring fixiert (Abbildung 1D). In der Regel konnte der Eingriff in weniger als 30 Minuten durchgeführt werden. Gelegentlich kam es bei der Präparation der Kammer zu kleineren Einblutungen, welche meist spontan sistierten oder durch ganz leichten Druck (es reichte schon das Auflegen) eines Stieltupfers gestoppt werden konnten. Zum Wiedererwachen wurden die Tiere, in ausreichendem Abstand, in ihren Käfigen vor eine Rotlicht-Wärmelampe gestellt. Die Operation selber sowie die Rückenhautkammer stellten für die Tiere nur eine geringe Belastung dar, was sich im normalen postoperativen Verhalten zeigte. Insbesondere der Schlaf-Wach-Rhythmus und das Fressverhalten waren unverändert.

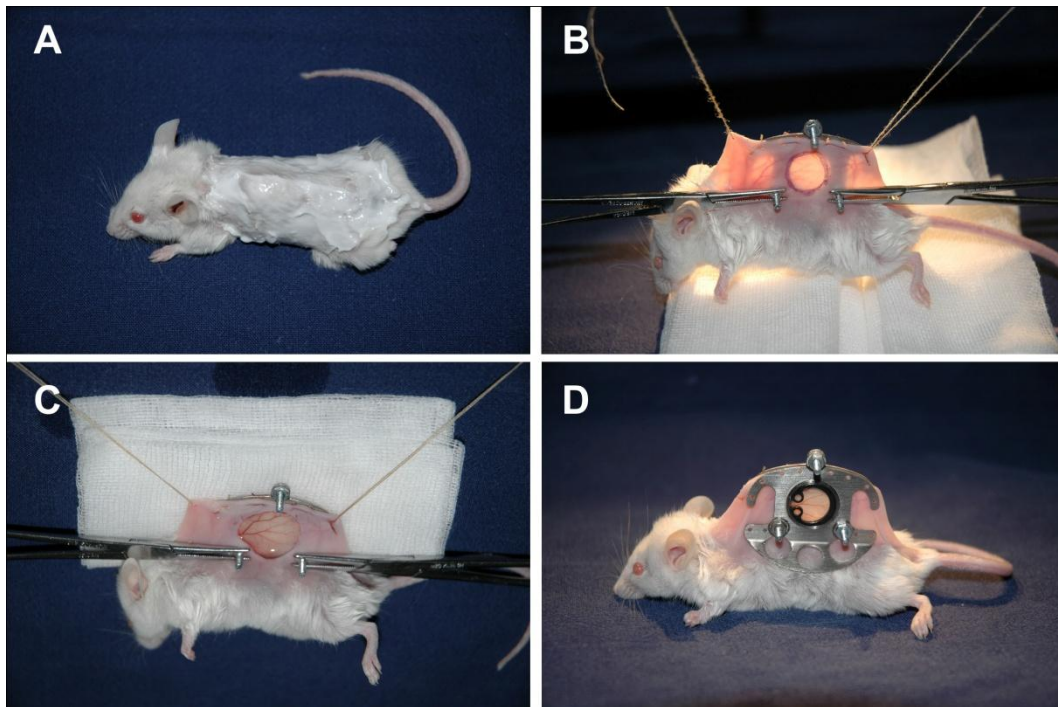


Abbildung 1: Präparation der Rückenhautkammer

Maus nach Auftragen der Epilationscreme (A), nach Anbringen der hinteren Kammerhälfte und Markierung des Präparationsfeldes (B), mit präparierter Beobachtungsfläche (C) sowie mit fertiger Rückenhautkammer (D).

3.4. Tumorapplikation

Um die Wirkung von MIP-2 – exogen zugeführt oder endogen durch Leberresektion ausgeschüttet - zu erforschen wurde nach einer, sich der Präparation der Rückenhautkammer anschließenden, 48h Rekonvaleszenzphase das Deckglas zur Tumorimplantation kurzzeitig entfernt (Tag 0). Danach wurden 1×10^5 CT26-GFP Zellen (ATCC CRL-2638, LGC Promochem GmbH, Wesel, Deutschland) mit Hilfe einer Eppendorf- Pipette auf das gestreifte Muskelgewebe innerhalb der Kammer gegeben. Direkt nach der Zellimplantation wurde die Kammer durch erneutes Einsetzen eines Deckglases verschlossen.

3.5. Versuchsreihe exogenes MIP-2 - topisch

In dieser Versuchsreihe gab es zwei Versuchsgruppen, die Kontrollgruppe KON, sowie die Versuchsgruppe MIP-2. Der Unterschied lag in der topisch applizierten Substanz und ist zum schnellen Überblick in Tabelle 1 dargestellt.

| Gruppe | Topische Applikation |
|--------|----------------------|
| KON | 10 µl PBS + 0,1% BSA |
| MIP-2 | 10 µl MIP-2 100nM |

Tabelle 1: Überblick der Versuchsanordnung der zwei Versuchsgruppen

Am 5. Tag nach Tumorimplantation (Tag 5) erfolgte unter Narkose ein erneutes Öffnen der Kammer unter Entfernen des Kapselspannrings und des Deckgläschens und die Applikation von 10µl PBS (Phosphat Buffered Salin) bei der Kontrollgruppe KON bzw. 10 µl einer 100 nM MIP-2 beinhaltenden Suspension (452-M2, R&D Systems, USA) bei der Versuchsgruppe MIP-2.

3.6. Versuchsreihe endogenes MIP-2 - Leberresektion

In dieser Versuchsreihe gab es drei Versuchsgruppen: die als Kontrollgruppe dienende Gruppe PHx, bei der lediglich die Leberresektion durchgeführt wurde, sowie die beiden Versuchsgruppen PHxmAK0 und PHxmAK5, welche zu zwei verschiedenen Zeitpunkten mit anti-MIP-2 (1mg/kg KG; MAB452, R&D Systems Inc., USA) als systemische Therapie begannen. Bei der Versuchsgruppe PHxmAK0 waren dies insgesamt sieben Injektionen, beginnend an Tag 0, bei der Versuchsgruppe PHxmAK5 lediglich fünf Injektionen, beginnend am Tag 5. Zu einer schnellen Übersicht dient Tabelle 2.

| Gruppe | Leberresektion | systemische Therapie |
|---------|----------------|----------------------|
| PHx | ja, ~30% | nein |
| PHxmAK5 | ja, ~30% | anti-MIP-2 ab Tag 5 |
| PHxmAK0 | ja, ~30% | anti-MIP-2 ab Tag 0 |

Tabelle 2: Überblick der Versuchsanordnung der drei Versuchsgruppen

Um die Wirkung von endogenem MIP-2 nach Leberresektion zu erforschen wurde zwei Tage nach der Kammerpräparation und vor Applikation des Tumors beim narkotisierten Tier das Abdomen rasiert. Dann wurde das Tier an allen vier Extremitäten mit Leukosilk® (BSN medical, Hamburg, Deutschland) auf einer speziell dafür angefertigten Korkplatte fixiert. Es erfolgte eine mediane Laparotomie, kranial

so endend, dass das Xiphoid komplett freilag. Nach Durchtrennung der am Xiphoid ansetzenden Bändchen wurde dies mit Hilfe einer Klemme in Kopfrichtung mobilisiert und fixiert. Die beiden Hälften der Bauchdecke wurden ebenfalls mittels zweier Klemmen nach lateral ausgelagert. Nach senkrechter Positionierung von zentralem und linkem Leberlappen am Diaphragma erfolgte die Durchtrennung des Ligamentum falciforme zwischen linkem Leberlappen und Lobus caudatus. Ein Vicryl® 5-0 Faden (Ethicon, Norderstedt, Germany) wurde unter den linken Lappen gebracht und hilusnah geknotet. Danach wurde das von der Blutversorgung abgetrennte Lebergewebe reseziert. Die so durchgeführte Leberresektion entsprach ~30% des Volumens der gesamten Leber. Nach NaCl- Spülung des Abdomens und Kontrolle der Bluttrockenheit wurde das Abdomen allschichtig mittels Prolene® 4-0 (Ethicon, Norderstedt, Germany) fortlaufend verschlossen.

Zur systemischen Therapie wurde intraperitoneal ein MIP-2-Antikörper (MAB452; R&D Systems Inc., USA) in der Konzentration 1mg/kg KG injiziert. In der Versuchsgruppe PHxmAK0 erfolgten die Injektionen am Tag 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 12, in der Versuchsgruppe PHxmAK5 am Tag 5, 7, 9, 11 und 13. Die Gruppe PHx diente der Kontrolle und erhielt keine Injektionen.

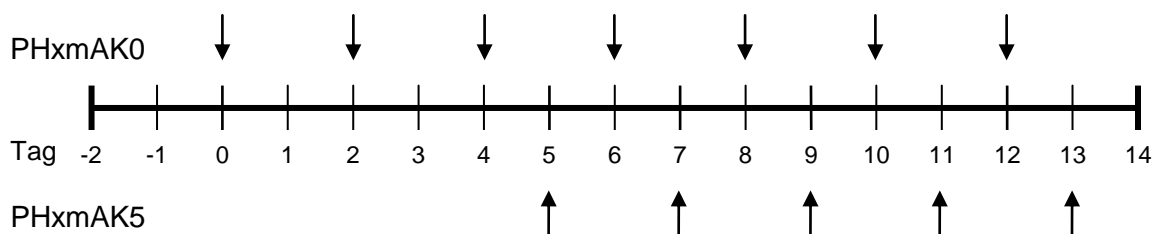


Abbildung 2: Zeitstrahl mit Zeitpunkten der MIP-2 Antikörper-Therapie

3.7. Mikroskopie

Die Durchführung der Intravitalmikroskopie fand an insgesamt sechs Zeitpunkten statt (Abbildung 3). Vorgelagert war immer eine kurze Aufnahme mit einem Lichtstrahl-OP-Mikroskop, welche der makroskopischen Dokumentation des Tumors diente.

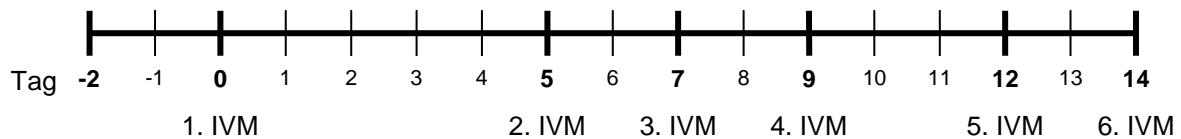


Abbildung 3: Zeitstrahl mit Zeitpunkten der Intravitalmikroskopie

Das zur Darstellung des Tumors und der Blutgefäße benutzte Intravitalmikroskop bestand aus einem modifizierten Zeiss Axio-Tech Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer 100 Watt HBO-Quecksilberdampf-Lampe als Lichtquelle (HBO 100W; Osram Augsburg, Germany), die an ein FluoArc-Steuersystem (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) zur Regulation der Helligkeit der Auflichtbeleuchtung angeschlossen war. Unter Zuhilfenahme eines in den Strahlengang des Mikroskops eingebrachten Blaulicht-Filters (450-490 nm Exzitations- und >520 nm Emissionswellenlänge) konnten mikrozirkulatorische Prozesse und Parameter sichtbar gemacht werden. Am letzten Tag wurde zusätzlich neben der nativen Mikroskopie als Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluorescein-Isothiozyanat) retrobulbär gespritzt. Zur späteren Off-line Bearbeitung wurden die mikroskopischen Bilder mit Hilfe einer hochempfindlichen Charge-Couple-Device-(CCD-) Videokamera (FK 6990; Prospective Measurements Inc, San Diego, CA, USA) an einen S-VHS Videorekorder (VO-5800 PS, Sony, München, Deutschland) weitergeleitet und dort auf S-VHS Videobänder (Fuji Magnetics GmbH, Kleve, Deutschland) aufgenommen.

Bei der Intravitalfluoreszenzmikroskopie wurden folgende 3 Objektive verwendet:

- 4 x: UPlanFI, Olympus, Japan, n.A. 0,13
- 10 x: Plan Neofluar, Carl Zeiss, Jena, Deutschland, n.A. 0,30
- 20 x / Wasserimmersion: Achroplan, Carl Zeiss, Jena, Deutschland, n.A. 0,5

Mit dem 4x- Objektiv erfolgte nur eine Gesamtaufnahme des Tumors. Mit Hilfe des 10x- Objektives erfolgten acht Aufnahmen (1-8) am Tumorrand, sowie vier Aufnahmen (A-D) im Tumorzentrum (Abbildung 4). Ab der zweiten IVM schloss sich

daran noch eine Untersuchung mit dem 20x- Objektiv an. Hierbei waren 24 Felder (Abbildung 4) von Interesse, von denen sich 16 (als 1-8 jeweils A und B) am Tumorrand, vier (A-D) im Tumorzentrum und vier (E-H) im Host- Gewebe außerhalb des Tumors befanden.

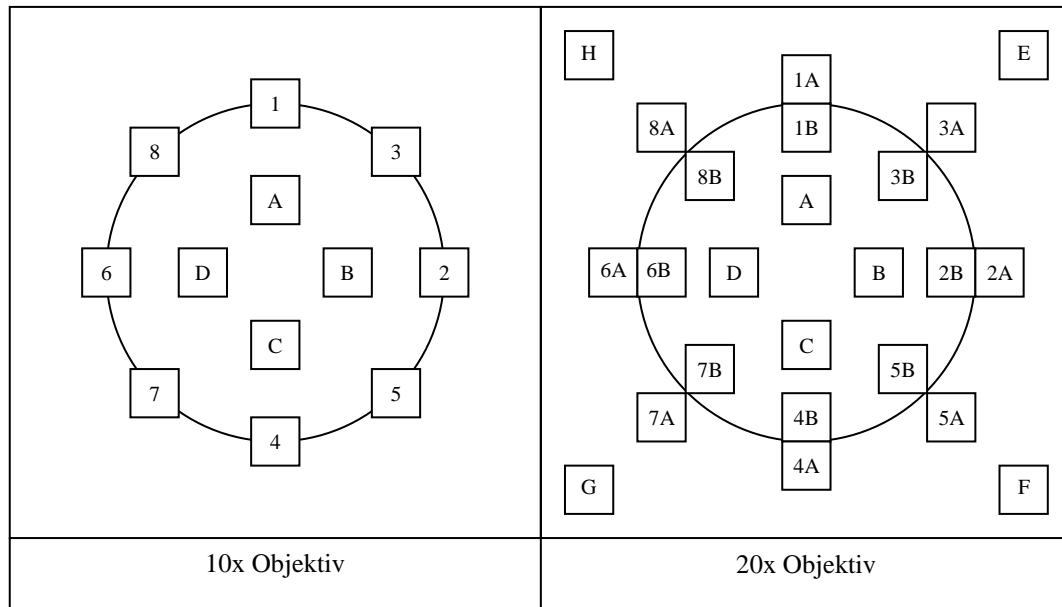


Abbildung 4: Anordnung der Untersuchungsfelder

3. 8. Auswertung der Intravitalmikroskopie

Die Auswertung der Intravitalmikroskopie erfolgte nach Versuchsende mit den aufgenommenen Videobändern an einem Computer, an den ein S-VHS Videorekorder (AG-7350, Panasonic, Ratingen, Germany) sowie ein Sony- Monitor (PVM 2130 QM, Sony, München, Germany) angeschlossen waren. Das zur Analyse benutzte Programm war CAPIMAGE V. 5.03 (Zeintl Software Engineering, Heidelberg, Deutschland). Die bei der Videoauswertung zu untersuchenden Parameter waren in der 16fachen (4x Objektiv, 4x Okular) Vergrößerung vier Tumordurchmesser [mm] (horizontal, vertikal und zweimal diagonal) und die Tumoorfläche [mm²]. In der 40fachen (10x Objektiv, 4x Okular) Vergrößerung wurde das Vorhandensein von Migration und Neoangiogenese in den 8 Beobachtungsfeldern (1-8) mit vorhanden (1) oder nicht vorhanden (0) bewertet und damit ein Score x/8 erstellt. Als weiterer Parameter wurde der Abstand [µm] der am weitesten vom Tumorrand migrierten CT26-GFP Zelle ermittelt. In der 80fachen (20x Objektiv, 4x Okular) Vergrößerung erfolgte dann eine Ermittlung der Kapillardichte

[cm/cm²] und des Kapillardurchmesser [μ m] in den acht Feldern (1-8, jeweils B) des Tumorrandes sowie in den vier Feldern (A-D) des Tumorzentrums. Hierbei wurde der Durchmesser von fünf Gefäßen, welche als repräsentativ für den untersuchten Tumorbereich zu betrachten waren, senkrecht zum Gefäßverlauf gemessen. In diesen zwölf Feldern wurde auch das Vorhandensein von petechialen Blutungen mit vorhanden (1) und nicht vorhanden (0) bewertet und erneut ein Score $x/8$ gebildet. In den acht Feldern (1-8, jeweils A) des Tumorrandes wurde in einer vorher definierten Fläche von 0,05 mm² quantitativ die Anzahl der migrierten Zellen erfasst. Außerdem wurde die Zellform der migrierten Zellen bewertet, die sich während der Migration spindelförmig ausziehen. Es wurde ein Score erstellt, bei dem die Zahl der spindelförmig ausgezogenen Zellen pro vier Zellen angegeben wurde [$x/4$].

3.9. Versuchsende und Entnahme von Gewebeproben

Nach Beendigung der Tierexperimente am Tag 14 wurden die Tiere durch die intraperitoneale Injektion von 0,3 ml unverdünntem Pentobarbital-Natrium (Narcoren[®], Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) eingeschläfert. Der Tumor wurde dann mit dem umgebenden Gewebe entnommen und in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde in 4%iger Formaldehydlösung (Roti-Histofix 4%[®], Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) fixiert, die zweite Hälfte in Tissue Freezing Medium (Jung; Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) eingelegt und durch Eintauchen in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte dann bei -80°C.

3.10. Erstellung histologischer Präparate

Die Einbettung der in Formaldehyd fixierten Gewebeproben erfolgte in Paraffin nachdem die Gewebeprobe mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert wurde. Mit einem Schlittenmikrotom wurden Präparate mit einer Schichtdicke von 5 μ m angefertigt. Als Standardfärbung diente die Hämatoxylin-Eosin (HE-) Färbung nach Mayer. Als weitere Färbung der in Formaldehyd fixierten Gewebeproben diente die PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) Färbung sowie die Caspase-3 Färbung. Hierbei wurden die Gewebeproben nach Entparaffinierung mittels indirekter Immunperoxidase-Technik gefärbt. Um endogene Peroxidasen und uncharakteristische Bindungsstellen zu blockieren wurden die Schnitte mit 3%igem Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und 2%igem normalem Ziegenserum inkubiert. Als

Primärantikörper gegen PCNA wurde ein monoklonaler Maus-anti-Pan-PCNA-Antikörper (PC10; 1:50; DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) verwendet. Ein polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-Caspase-3-Antikörper (ASP175, 1:50, Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) diente als Primärantikörper gegen gespaltene Caspase-3. Biotinylierte Ziegen-anti-Maus- und Ziegen-anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper (1:200, LSAB 2 System HPR, DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) wurden als Sekundärantikörper für die Peroxidasereaktion verwendet. 3,3'-Diaminobenzidin (DakCytomation, Hamburg, Deutschland) diente als Chromogen. Es erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer.

Um die Expression des Chemokin Rezeptors CXCR-2 zu beurteilen wurden 5 µm Kryostatschnitte aus den Gewebeproben, welche im Tissue Freezing Medium schockgefroren wurden, angefertigt. Diese wurden für 5 Sekunden in 4°C kaltem Aceton, gefolgt von 10 Minuten in 4%igem Formaldehyd fixiert und durch 2%iges normales Eselserum geblockt. Die Gewebeschnitte wurden dann mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-Maus-CXCR-2-Antikörper (1:10; Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Ein Esel-anti-Kaninchen-IgG-Meerrettich-Peroxidase-konjugierter-Antikörper (1:500; Amersham, Freiburg, Germany) diente als sekundärer Antikörper. 3,3'-Diaminobenzidin (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) wurde als Chromogen benutzt. Die Schnitte wurden mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt.

3.11. Auswertung der histologischen Schnitte

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte semiquantitativ mit Hilfe der Auflichtmikroskopie. In der HE-Färbung wurde der prozentuale Anteil des invasiv in die Muscularis wachsenden Tumors an der Gesamttumorlänge bestimmt. In den immunhistochemischen Färbungen wurde der prozentuale Anteil der proliferativen Zellen (PCNA positiv), der apoptotischen Zellen (Caspase positiv) und der CXCR2-exprimierenden Zellen (CXCR2 positiv) an der Gesamtzellzahl ermittelt.

3.12. Statistische Auswertung

Die primäre Datenerfassung erfolgte während der Auswertung der Videobänder, sowie während der Lichtstrahlmikroskopie handschriftlich auf Dokumentationsbögen. Die so gewonnenen Daten wurden dann in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel®; Microsoft, Unterschleißheim, Germany) zur elektronischen Datenverarbeitung eingegeben. Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Programme SigmaStat® und SigmaPlot® (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Die Werte wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Bei zwei zu vergleichenden Gruppen erfolgte der Vergleich nach Prüfung auf Normalverteilung und Homogenität der Varianz mittels t-Test. Bei drei Versuchsgruppen wurden zunächst Unterschiede zwischen den Gruppen mittels Varianzanalyse (ANOVA) kalkuliert und anschließend ein entsprechender Post-Hoc-Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $<0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

Die Allgemeinbedingungen der Tiere wurden durch die Rückenhautkammer und die Tumorzellimplantation nicht beeinträchtigt. Alle Tiere hatten eine unauffällige postoperative Erholung und tolerierten die intravitalmikroskopischen Untersuchungen während der 14-tägigen Versuchsphase ohne Schwierigkeiten. In 100% der Fälle kam es zu einem erfolgreichen Anwachsen der CT26-GFP Zellen in der Rückenhautkammer der Balb/c Maus.

4.1. exogenes MIP-2 - topisch

4.1.1. Tumorwachstum

Am Tag der MIP-2 respektive PBS-Applikation auf den Tumor (Tag 5) zeigte sich ein kleiner solider Tumor, dessen Fläche in beiden Gruppen jeweils identisch war. Im Verlauf führte die lokale Applikation von MIP-2 zu einem deutlich beschleunigten Tumorwachstum in den MIP-2 behandelten Tumoren gegenüber der Kontrollgruppe KON. Der dadurch entstandene Unterschied in der Tumorfläche (Abbildung 5) war an den letzten beiden Untersuchungstagen (Tag 12 und 14) statistisch signifikant ($p < 0.05$) und trat am Tag 14 am deutlichsten hervor.

4.1.2. Tumervaskularisation

Am Tag 5 nach der Tumorapplikation zeigten sich nur in sehr wenigen Bereichen der Tumoren Zeichen der Neovaskularisation. Am Tag 7 konnte bereits in einigen der Beobachtungsfelder Neoangiogenese festgestellt werden. Die angiogene Antwort (Tabelle 3) nahm im Verlauf weiter zu und konnte am Ende der 14-tägigen Untersuchungsperiode in beinahe allen Beobachtungsfeldern nachgewiesen werden. Interessanterweise beeinflusste MIP-2 das zeitliche Auftreten der angiogenen Antwort verglichen zur Kontrollgruppe KON nicht.

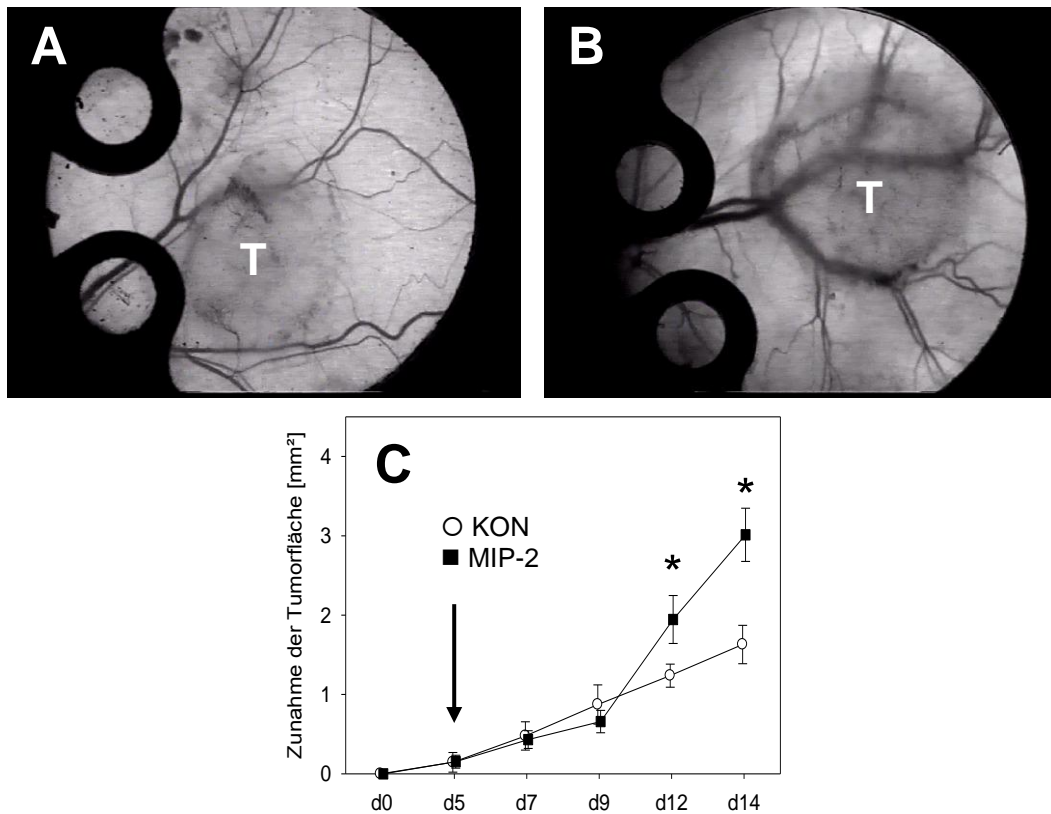


Abbildung 5: Tumorwachstum/Tumorfläche

Stereomikroskopische Dokumentation von repräsentativen Tumoren am Tag 14 nach lokaler Behandlung mit PBS (A; KON) und MIP-2 (B; MIP-2). Die quantitative Analyse der Zunahme der Tumorfläche (C) unter Verwendung der Intravitalfluoreszenzmikroskopie zeigte ein fortschreitendes Tumorwachstum in PBS-behandelten Kontrolltieren (weiße Kreise) und eine signifikante Beschleunigung nach MIP-2 Exposition (schwarze Vierecke). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$ vs. KON.

| Tag | KON | MIP-2 |
|-----|-----------------|-----------------|
| 0 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| 5 | 0.50 \pm 0.27 | 0.29 \pm 0.29 |
| 7 | 3.25 \pm 0.77 | 2.29 \pm 1.08 |
| 9 | 4.75 \pm 0.80 | 3.86 \pm 1.22 |
| 12 | 6.87 \pm 0.55 | 6.00 \pm 1.00 |
| 14 | 7.62 \pm 0.18 | 7.14 \pm 0.46 |

Tabelle 3: Auftreten von Tumorgefäßen

Die angiogene Antwort wurde durch einen Punkte-Score von 0-8 bewertet, wobei Score 0 bedeutete, dass in keinem der 8 Beobachtungsfelder neugebildete Gefäße zu sehen waren und Score 8 in allen Beobachtungsfeldern. Mittelwerte \pm SEM.

Die neugebildeten mikrovaskulären Netzwerke der Tumoren waren charakterisiert durch chaotisch angeordnete Kapillaren und große ableitende Venolen (Abbildung 6). Obwohl der Beginn der Tumor- Neovaskularisation zwischen den beiden Gruppen nicht differierte, war die Kapillardichte sowohl im Tumorrand als auch im Tumorzentrum in den MIP-2 behandelten Tumoren signifikant gegenüber der Kontrollgruppe KON (Abbildung 6) vermindert.

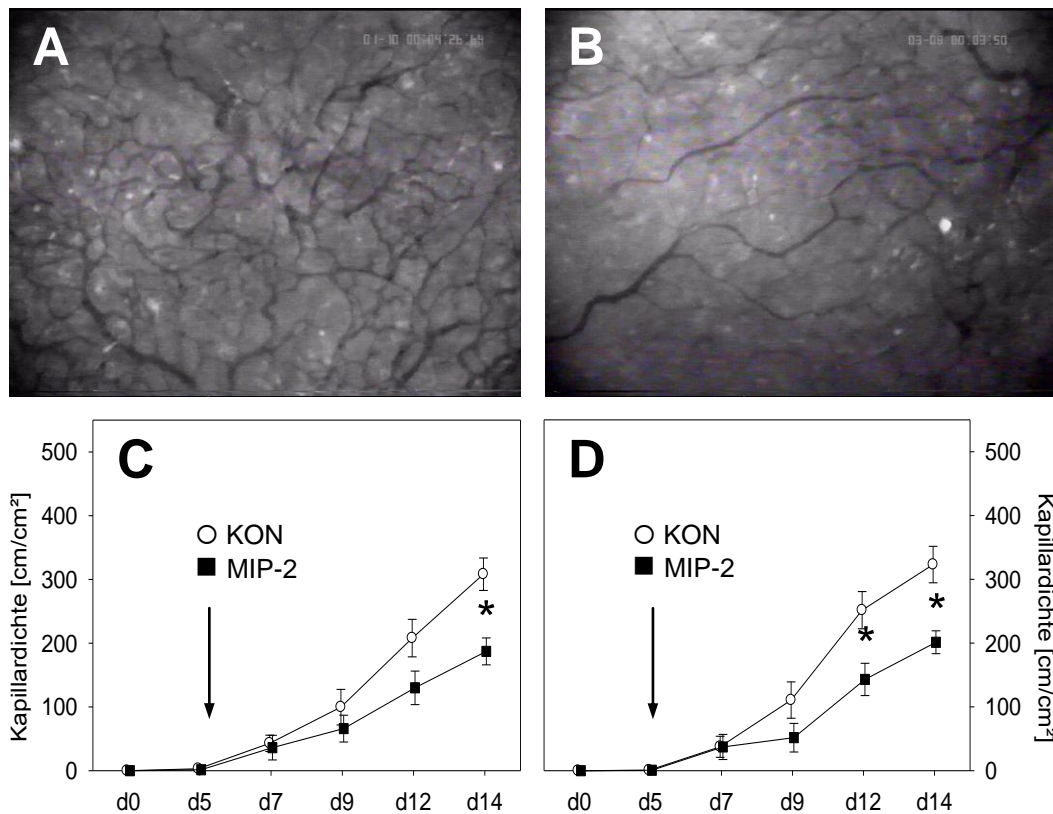


Abbildung 6: Kapillardichte

Kapillardichte von CT26-GFP Tumoren untersucht mit der Intravitalfluoreszenzmikroskopie in Rückenhautkammern von BALB/c Mäusen. Zu beachten ist die geringere Kapillardichte am Tag 9 nach MIP-2 Exposition (B, MIP-2) verglichen mit der Kontrollgruppe (A, KON). Die quantitative Analyse der Kapillardichte am Tumorrand (C) und im Tumorzentrum (D) bestätigten, dass die Vaskularisation während der ganzen Beobachtungsperiode zunahm ohne einen signifikanten Unterschied zwischen Tumorrand und -zentrum. Die MIP-2 Behandlung (schwarze Vierecke) resultierte in einer signifikant reduzierten Kapillardichte verglichen zur Kontrollgruppe KON (weiße Kreise). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$ vs. KON.

Die Angiogenese von Tumoren ist mit Vasodilatation und petechialen Blutungen, welche aus vaskulären Leckagen resultieren, assoziiert. Aus diesem Grund wurden die Kapillardurchmesser und die petechialen Blutungsflächen der Tumoren untersucht (Tabelle 4). Die Durchmesser der neu gebildeten Kapillaren betrugen zwischen 8,9 μm und 12,9 μm . Weder zwischen Tumorrand und –zentrum noch zwischen den MIP-2 behandelten Tumoren und der Kontrollgruppe KON gab es einen Unterschied. Die durch vaskuläre Leckage bedingten petechialen Blutungen wurden häufiger in Tumoren der Kontrollgruppe KON als in MIP-2 behandelten Tumoren gefunden. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Tabelle 4).

| Tag | Kapillardurchmesser | | Petechiele Blutungen | |
|-----------|---------------------|----------------|----------------------|---------------|
| | KON | MIP-2 | KON | MIP-2 |
| 5 | 12.9 \pm 1.5 | | 7.8 \pm 4.1 | 0.0 \pm 0.0 |
| 7 | 9.1 \pm 0.3 | 9.6 \pm 0.7 | 18.8 \pm 7.1 | 7.1 \pm 5.4 |
| 9 | 8.9 \pm 0.4 | 9.4 \pm 0.6 | 31.3 \pm 11.6 | 5.4 \pm 3.7 |
| 12 | 9.4 \pm 0.7 | 9.4 \pm 0.4 | 17.2 \pm 12.0 | 1.8 \pm 1.8 |
| 14 | 10.4 \pm 0.2 | 10.5 \pm 0.5 | 23.4 \pm 10.7 | 0.0 \pm 0.0 |

Tabelle 4: Kapillardurchmesser und Blutungen

Kapillardurchmesser neugebildeter Mikrogefäße im Tumorzentrum und petechiale Blutungen am Tumorrand. Kapillardurchmesser in [μm]; Fläche der petechialen Blutungen in [%]. Mittelwerte \pm SEM.

4.1.3. Tumorzellinfiltration

In den HE- Färbungen zeigte sich ein solides extrahepatisches Wachstum der kolorektalen CT26-GFP Tumorzellen in der Rückenhautkammer. Am Tag 14 zeigten die mit MIP-2 behandelten Tumoren nicht nur ein statistisch signifikant beschleunigtes Wachstum verglichen zur Kontrollgruppe KON, sondern auch ein deutlich invasiveres Wachstumsverhalten. Die quantitative Analyse zeigte, dass nach der MIP-2 Behandlung beinahe 30% der Tumorbasis das darunterliegende Muskelgewebe infiltriert hatte (Abbildung 7). In der Kontrollgruppe KON war der Invasivitätscharakter deutlich geringer ausgeprägt ($8,8\% \pm 4,6\%$). Diese Differenz war wegen der relativ hohen Inhomogenität der Werte jedoch nicht statistisch signifikant.

4.1.4. Tumorzellproliferation, -apoptose und CXCR2 Expression

Die immunhistochemische Färbung mit PCNA wurde genutzt um die Tumorzellproliferation als Antwort auf die MIP-2 Exposition zu untersuchen. Im Einklang zu der gesteigerten Infiltration des benachbarten Muskelgewebes zeigten die MIP-2 behandelten Tumoren eine signifikant ($p < 0.05$) gesteigerte Anzahl an proliferierenden Zellen am Rand sowie im Zentrum der Tumoren (Abbildung 7) verglichen mit denen der Kontrollgruppe KON. Um das Verhältnis zwischen Proliferation und Apoptose innerhalb der Tumoren zu untersuchen wurde zusätzlich immunhistochemisch die Apoptose mit Hilfe der gespaltener Caspase-3 untersucht. In PBS- behandelten Tumoren konnten apoptotische Zellen nur sehr vereinzelt aufgefunden werden. Diese geringe Apoptoserate wurde durch die MIP-2 Behandlung nicht beeinflusst. (Daten nicht gezeigt). Immunhistochemische Untersuchungen zeigten desweiteren, dass die Mehrheit der Zellen am Tumorrand CXCR2 positiv waren. Im Gegensatz dazu konnte in der Tumormitte nur ein geringer Anteil an Zellen gefunden werden, welche CXCR2 exprimierten (Abbildung 8). Die lokale Behandlung mit MIP-2 beeinflusste die CXCR2 Expression am Tumorrand nicht, jedoch erhöhte sie signifikant die Anzahl der CXCR2 positiven Zellen im Tumorzentrum verglichen zur Kontrollgruppe KON (Abbildung 8).

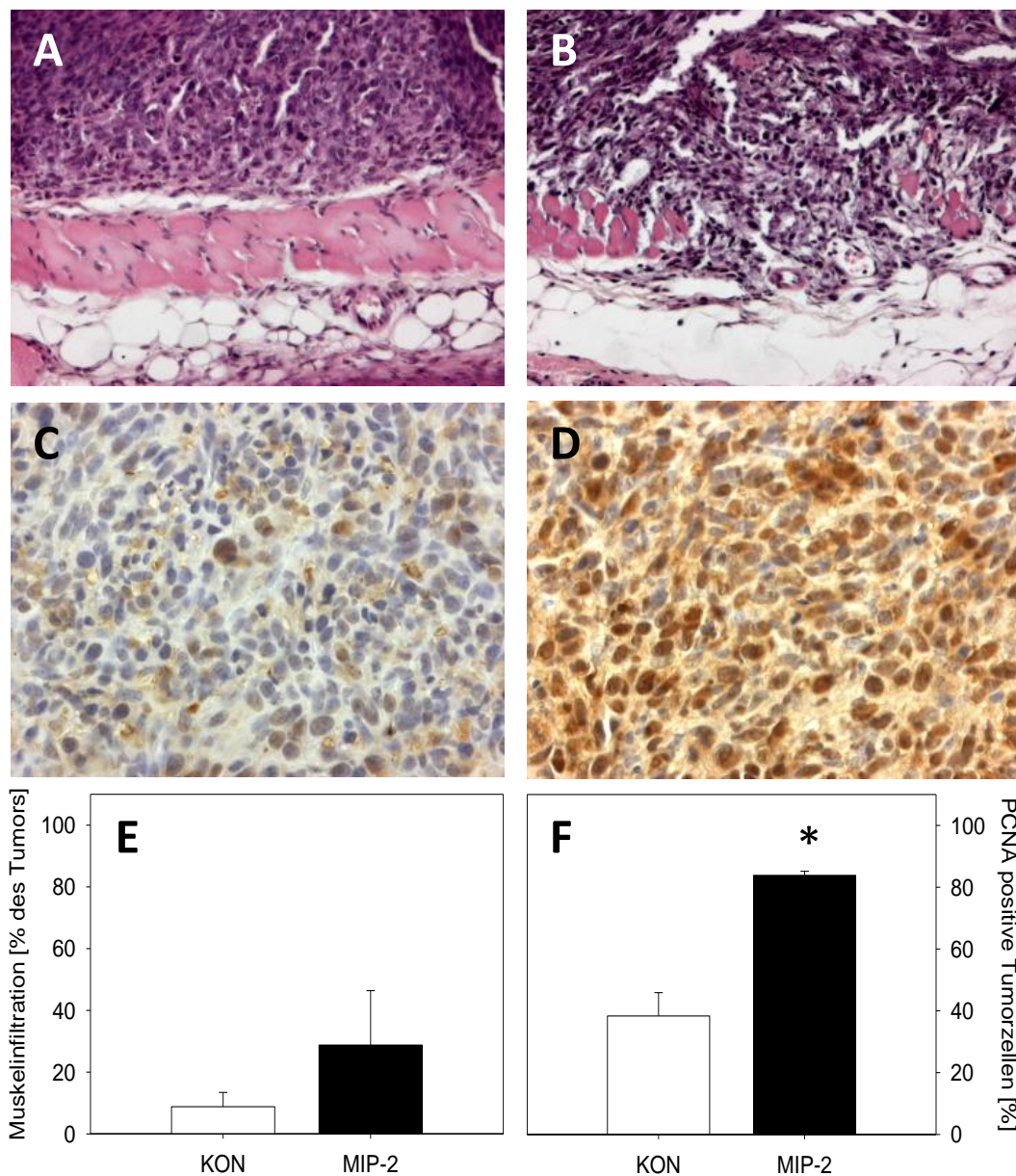


Abbildung 7: Muskelinfiltration und Proliferation

Hämatoxylin-Eosin Färbung von Tumoren am Tag 14 nach lokaler PBS (A, KON) und MIP-2 (B, MIP-2) Behandlung. Die Bilder zeigen solides extrahepatisches Wachstum von kolorektalen CT26-GFP Metastasen in der Rückenhautkammer, mit einem verstärkten infiltrativen Wachstum in das benachbarte Muskelgewebe nach MIP-2 Behandlung (B, MIP-2) verglichen zur Kontrollgruppe (A, KON). Die PCNA- Immunohistochemie (F) zeigte eine signifikant gesteigerte Zellproliferation am Tag 14 nach MIP-2 Behandlung (D, MIP-2) verglichen zur Kontrollgruppe (C, KON). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$ vs. KON.

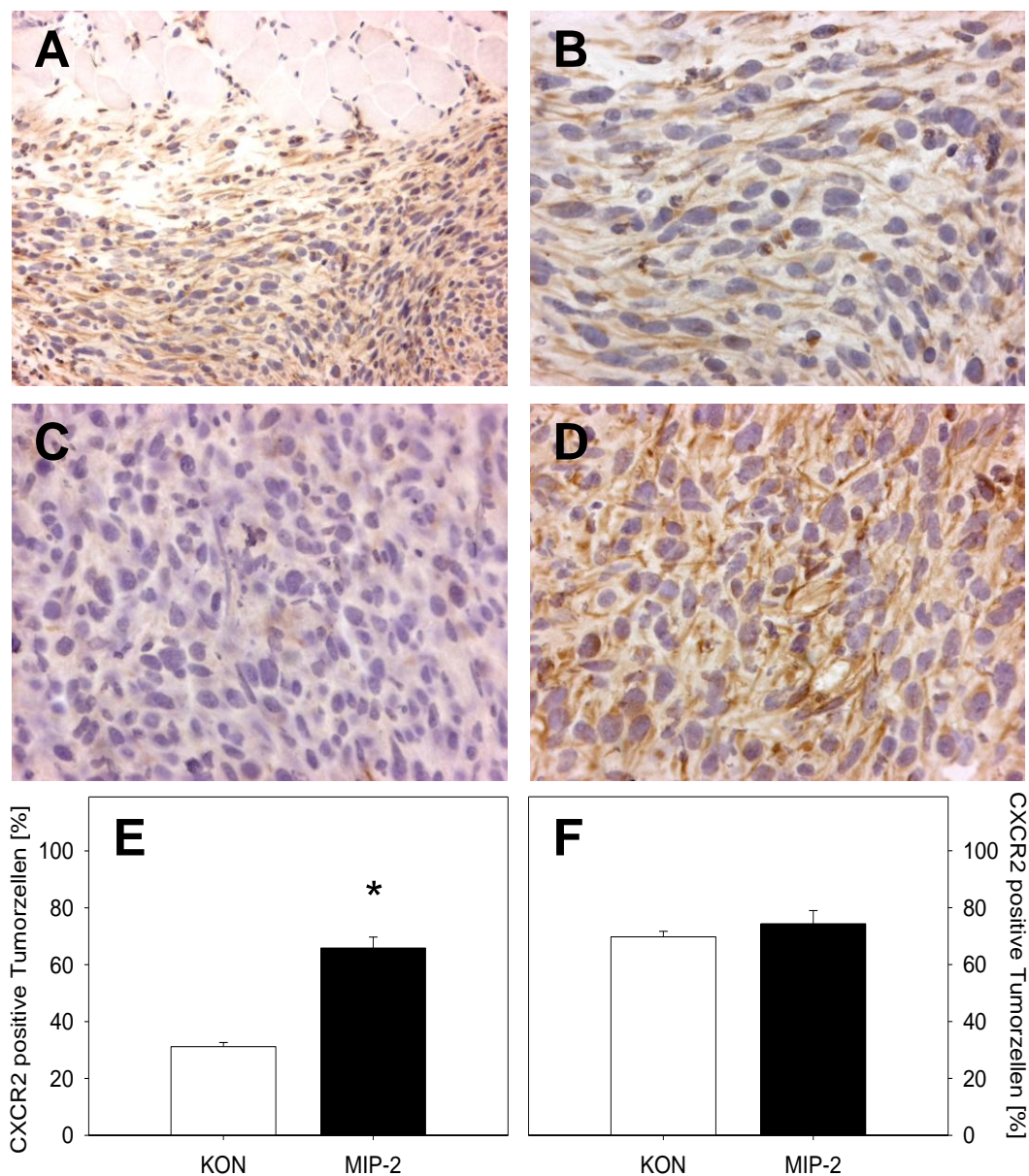


Abbildung 8: CXCR2-Expression

CXCR2 Immunohistochemie am Tag 14 nach PBS (A-C, KON) und MIP-2 (D, MIP-2) Behandlung. In der Kontrollgruppe exprimierte die Mehrheit der Zellen CXCR2 am Tumorrand (A, B, KON), wohingegen im Tumorzentrum nur eine geringere Zahl der Zellen CXCR2 positiv (C, KON) war. Die MIP-2 Behandlung (D, MIP-2) steigerte signifikant die CXCR2 Expression im Tumorzentrum (E), beeinflusste die CXCR2 Expression der Zellen am Tumorrand jedoch nicht (F). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$ vs. KON.

4.2. endogenes MIP-2 - Leberresektion

4.2.1. Tumorwachstum

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen zeigten ein zunehmendes Tumorwachstum während der 14-tägigen Versuchsphase. Quantitative Analysen der Tumorfläche (Abbildung 9) zeigten, dass nur die direkt am Tag der Leberresektion begonnene Behandlung mit anti-MIP-2 (PHxmAK0) in der Lage war eine signifikante Verringerung ($p < 0.05$) der Tumorfläche während der ersten neun Tage verglichen zur leberresezierten Kontrollgruppe (PHx), zu bewirken. Während des weiteren Verlaufs der 14-tägigen Untersuchungsperiode konnte die Fortführung der MIP2-Antikörpertherapie die Beschleunigung des Tumorwachstums nicht verhindern. In der Versuchsgruppe PHxmAK5 mit einem bereits etablierten Tumor, bei der mit der anti-MIP-2 Therapie erst am fünften Tag nach Leberresektion begonnen wurde, konnte kein Effekt auf das Tumorwachstum (Abbildung 9) beobachtet werden.

Die Tumormasse genauso wie die einzelnen CT26-GFP Zellen konnten wegen ihrer grün-fluoreszierenden Markierung gut mit Hilfe der Intravitalmikroskopie betrachtet werden (Abbildung 10). Interessanterweise konnte die Tumorzellmigration am Tumorrand (Abbildung 10) während der kompletten 14-tägigen Untersuchungsphase beobachtet werden. Migrierende Zellen zeigten eine spindelförmige Konfiguration, wohingegen die Zellen innerhalb der Tumormasse sich in eher rundlicher Struktur präsentierten. Die migrierenden Tumorzellen hatten einen mittleren Abstand von 290 bis 420 μm zum Tumorrand, unabhängig davon, ob es sich um eine der beiden Versuchsgruppen PHxmAK0 respektive PHxmAK5 oder die Kontrollgruppe PHx handelte. Die Versuchsgruppe PHxmAK0 zeigte jedoch eine signifikant ($p < 0.05$) erhöhte Anzahl an migrierenden Zellen (Abbildung 10) über den kompletten 14tägigen Beobachtungszeitraum hinweg verglichen mit der Kontrollgruppe PHx sowie der anderen Versuchsgruppe PHxmAK5.

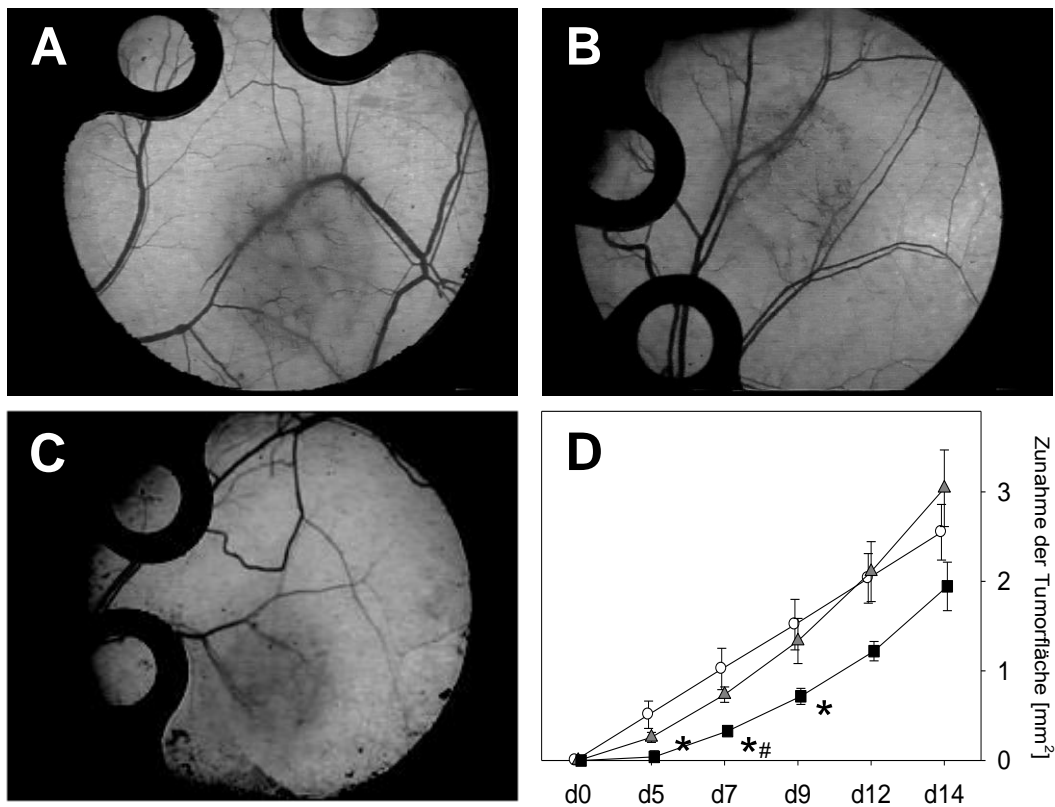


Abbildung 9: Tumorfläche

Stereomikroskopische Photographien von repräsentativen Tumoren in der Rückenhautkammer am Tag 14 nach Leberresektion ohne Behandlung (A; PHx), mit anti-MIP-2 Behandlung ab Tag 5 (B, PHxMAK5), und mit anti-MIP-2 Behandlung ab Tag 0 (C, PHxMAK0). Quantitative Analyse der Tumorfläche (D) zeigte eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums während der ersten 9 Tage nach Tumorimplantation bei Tieren, deren anti-MIP-2 Behandlung am Tag 0 (schwarze Vierecke) begonnen worden war verglichen mit der Kontrollgruppe PHx (weiße Kreise). Die anti-MIP-2 Behandlung, welche am Tag 5 nach Leberresektion begonnen worden war (graue Dreiecke), hemmte das Tumorwachstum nicht. Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$ vs. PHx; # $p < 0.05$ vs. PHxMAK5

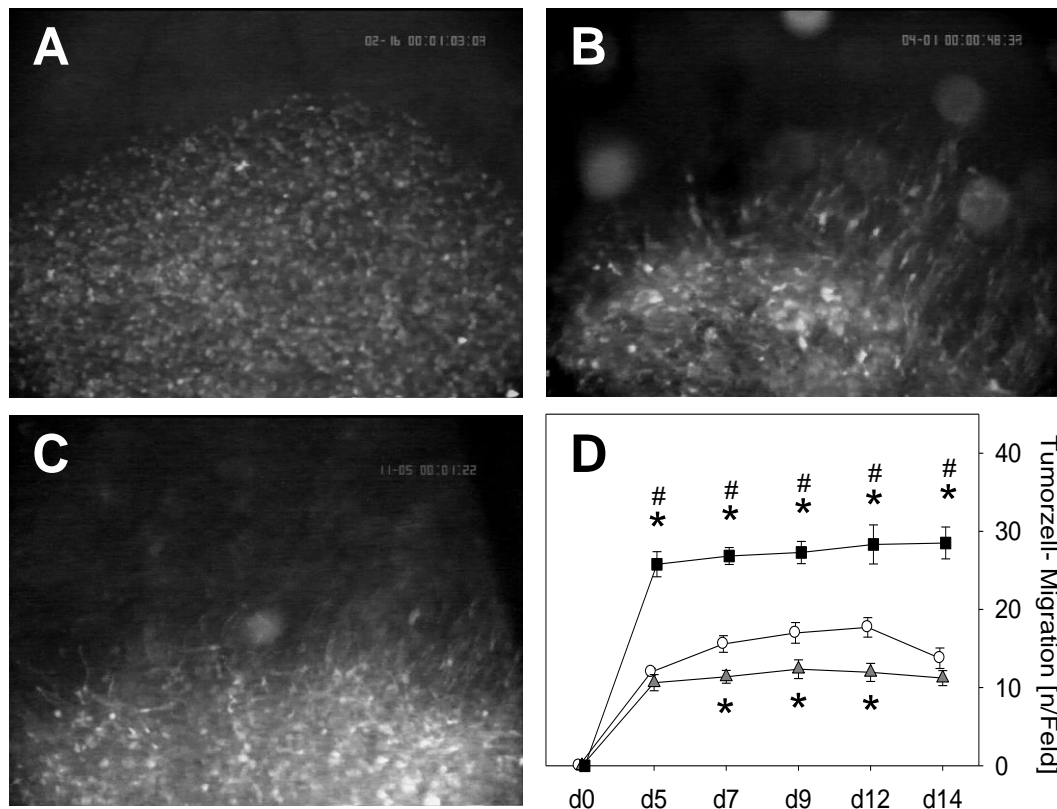


Abbildung 10: Tumorzellmigration

Intravitalfluoreszenzmikroskopie der Tumorzellmigration am Tumorrand. Während direkt nach Implantation keine Tumorzellen außerhalb des Tumorrandes gefunden werden konnten (Qualitätskriterium der Tumorzellimplantation, A), konnte Zellmigration ab Tag 5 nach Implantation in in allen Gruppen beobachtet werden. Eine Behandlung mit anti-MIP-2 ab Tag 0 zeigte einen Anstieg der Tumorzellmigration (C, PHxMAK0) verglichen mit Tumoren der Kontrollgruppe (B, PHx). Die quantitative Analyse (D) bestätigte die gesteigerte Tumorzellmigration in der anti-MIP-2 Versuchsgruppe ab Tag 0 (schwarze Vierecke) verglichen mit Tumoren, deren Behandlung erst am Tag 5 gestartet wurde (graue Dreiecke) oder der Kontrollgruppe PHx (weiße Kreise). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$ vs. PHx; # $p < 0.05$ vs. PHxMAK5

4.2.2. Tumervaskularisation

Die Intravitalmikroskopie zeigte, dass der Start der angiogenen Reaktion, z.B. das Auftreten von Gefäßaussprossungen, am fünften Tag initialisiert wurde. Am zwölften Tag zeigten beinahe alle betrachteten Beobachtungsfelder Gefäßaussprossungen. Die anti-MIP-2 Behandlung, unabhängig davon, ob sie an Tag 0 wie bei der Versuchsgruppe PHxmAK0 oder an Tag 5 wie bei der Versuchsgruppe PHxmAK5 gestartet wurde, zeigte keinerlei Effekt auf den Beginn der Angiogenese (Abbildung 11). Die Analyse der funktionellen Neovaskularisation der extrahepatischen Metastasen zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der funktionellen Dichte der Tumorkapillaren von Tag 5 bis Tag 14 mit Endwerten um die 250 cm/cm². Interessanterweise zeigte sich bei der Versuchsgruppe PHxmAK0, deren anti-MIP-2 Behandlung direkt an Tag 0 begonnen worden war ein signifikanter Anstieg ($p < 0.05$) der funktionellen Kapillardichte während der späten Phase des 14-tägigen Beobachtungszeitraums. Dies wurde sowohl im Tumorrand (Abbildung 11) als auch im Tumorzentrum (Daten nicht gezeigt) beobachtet. Bei der Versuchsgruppe PHxmAK5, deren Therapie erst an Tag 5 begonnen wurde, konnte dieser Anstieg nicht beobachtet werden. Der Durchmesser der Kapillaren reichte von 9 bis 13 µm während der 14-tägigen Beobachtungsphase. In den Tieren der Kontrollgruppe PHx und der Versuchsgruppe PHxmAK0 konnte eine Zunahme des Kapillardurchmessers beobachtet werden, der bei den Tieren der Versuchsgruppe PHxmAK5 nicht auftrat. Die Kapillardurchmesser des Tumorzentrums (Abbildung 11) unterschieden sich nicht von denen des Tumorrandes (Daten nicht gezeigt).

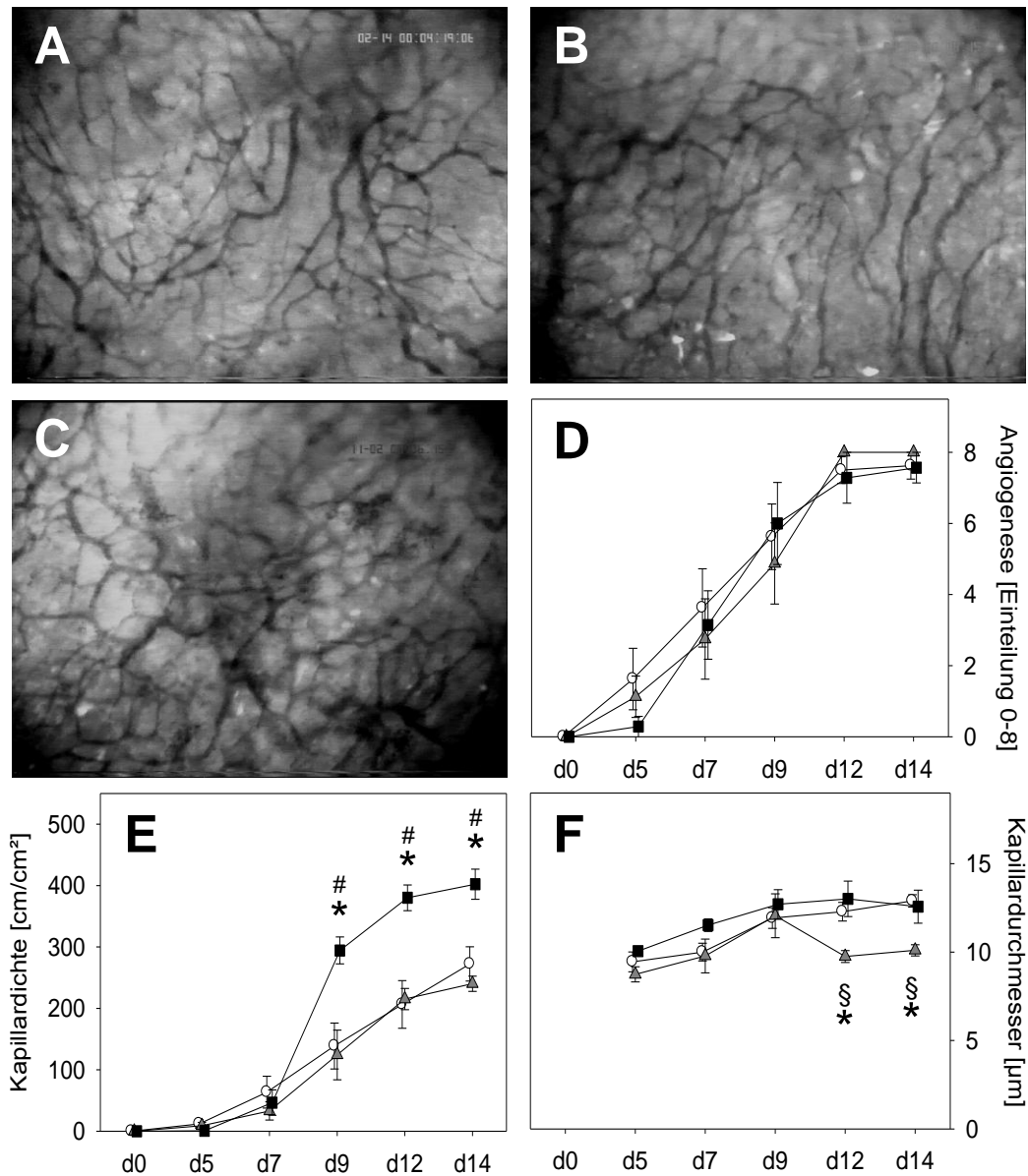


Abbildung 11: Kapillardichte

Intravitalfluoreszenzmikroskopie von repräsentativen Tumoren in der Rückenhautkammer am Tag 14 nach Leberresektion ohne Behandlung (A; PHx), mit anti-MIP-2 Behandlung ab Tag 5 (B; PHxAK5), und mit anti-MIP-2 Behandlung ab Tag 0 (C; PHxAK0). Die quantitative Analyse des Auftretens von neuen Kapillaren (D) zeigte dass am Tag 12 neue Gefäßformationen in beinahe allen Beobachtungsfeldern beobachtet werden konnten ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den drei Versuchsgruppen PHxAK0 (schwarze Vierecke), PHxAK5 (graue Dreiecke) und PHx (weiße Kreise). Die Analyse der funktionellen Kapillardichte (E) zeigte einen signifikanten Anstieg während der späten Beobachtungsphase von Tag 9 bis 14 in Tumoren bei denen die anti-MIP-2 Behandlung an Tag 0 (PHxAK0) begonnen worden war, verglichen zu den Tumoren der Kontrollgruppe (PHx). Der Durchmesser der Tumorkapillaren (F) bewegte sich zwischen 9 und 13 μm während der 14-tägigen Beobachtungsperiode. Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$ vs. PHx; # $p < 0.05$ vs. PHxAK5; § $p < 0.05$ vs. PHxAK0.

Die verstärkte Permeabilität von Tumorgefäßen, welche während der Angiogenese beobachtet wird, ist häufig mit petechialen Blutungen assoziiert. In der Versuchsgruppe PHxmAK0, nicht aber in der Versuchsgruppe PHxmAK5, konnten ausgeprägte Blutungen während der initialen Phase der Angiogenese beobachtet werden. Das Auftreten der Blutungen war jedoch nicht signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe PHx. Es gab innerhalb der Gruppen keinen Unterschied zwischen der Häufigkeit der petechialen Blutungen am Tumorrand (Abbildung 12) und im Tumorzentrum (Daten nicht gezeigt).

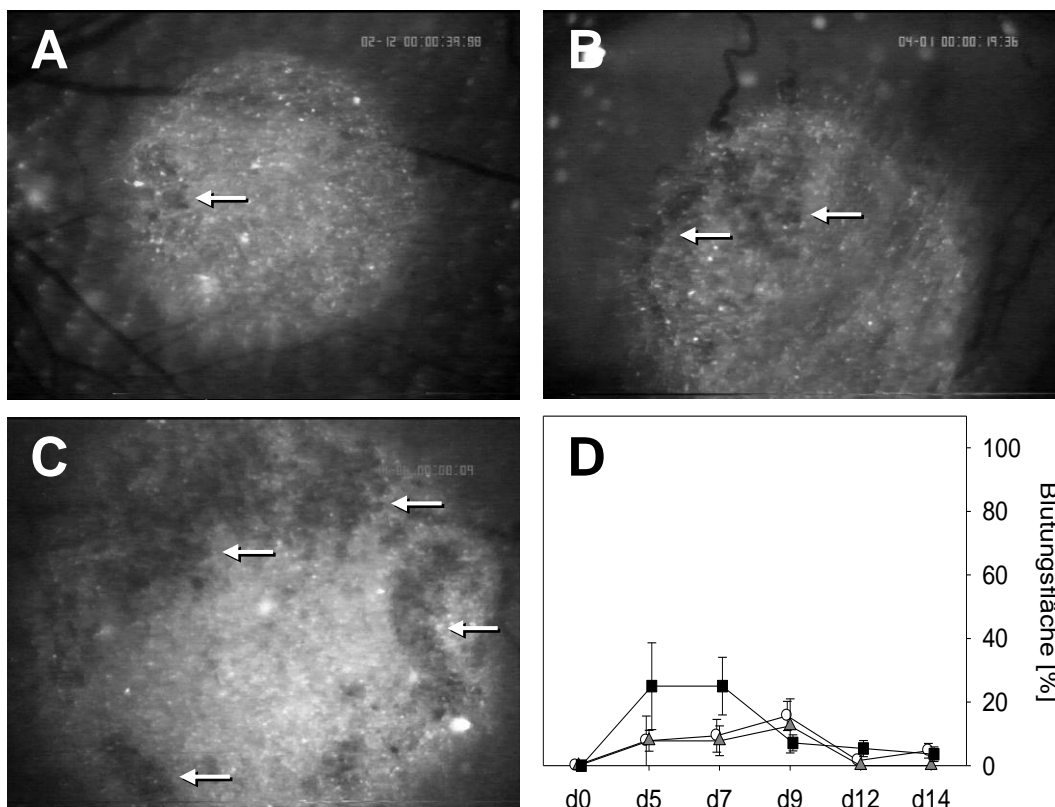


Abbildung 12: Blutungen

Intravitalfluoreszenzmikroskopie von petechialen Blutungen (Pfeile) in Tumoren am Tag 5 nach Tumorzellimplantation ohne Behandlung (A; PHx), mit anti-MIP-2 Behandlung ab Tag 5 (B; PHxmAK5), und mit anti-MIP-2 Behandlung ab Tag 0 (C; PHxmAK0). Die quantitative Analyse von Blutungen in den Beobachtungsfeldern (D) zeigte bei bereits am Tag 0 mit anti-MIP-2 behandelten Tieren (schwarze Vierecke) mehr Blutungen während der initialen Phase der Angiogenese verglichen zur Kontrolle PHx (weiße Kreise). Dies konnte bei den erst ab Tag 5 mit anti-MIP 2 behandelten Tieren (graue Dreiecke) nicht beobachtet werden. Mittelwert \pm SEM.

4.2.3. Tumorzellinfiltration

Die HE- Färbung zeigte eine Tumorzellinfiltration in den benachbarten Muskel von $35,7 \pm 15,9\%$ der Tumorbasis in der leberresizierten Kontrollgruppe (PHx). Die zusätzliche Behandlung mit anti-MIP-2 beeinflusste die Tumorzellinvasivität nicht, wie die Infiltration von $38,5 \pm 14,4\%$ in der Versuchsgruppe PHxmAK0 und $42,7 \pm 11,7\%$ in der Versuchsgruppe PHxmAK5 zeigte. (Daten nicht gezeigt)

4.2.4. Tumorzellproliferation, -apoptose und CXCR2- Expression

PCNA als Indikator für die Tumorzellproliferation zeigte eine starke Färbung der Tumorzellen in der Kontrollgruppe PHx am Tag 14 nach Leberresektion. Insgesamt waren mehr als 80% der Tumorzellen PCNA positiv (Abbildung 13). Die Behandlung mit anti-MIP-2 verringerte die Anzahl PCNA positiv gefärbter Tumorzellen am Tag 14 nach Leberresektion auf 40% wenn die Behandlung am 5. Tag und 60% wenn die Behandlung am Tag der Leberresektion begonnen wurde. Die Caspase-3 Immunhistochemie wurde zur Untersuchung von Apoptosen durchgeführt. Caspase-3 positive Zellen (Abbildung 13) konnten nur sehr vereinzelt in allen drei Gruppen beobachtet werden und überschritten nie den Wert von 0.5% aller Tumorzellen pro Bildausschnitt. Dennoch konnte die Therapie mit anti-MIP-2 die Anzahl der apoptotischen Tumorzellen signifikant gegenüber den Tumoren der Kontrollgruppe PHx senken. Die Zahl der Apoptosen (Abbildung 13) konnte um 60% bei Tieren in der Versuchsgruppe PHxmAK5 und sogar um 85% in der Versuchsgruppe PHxmAK0 gesenkt werden.

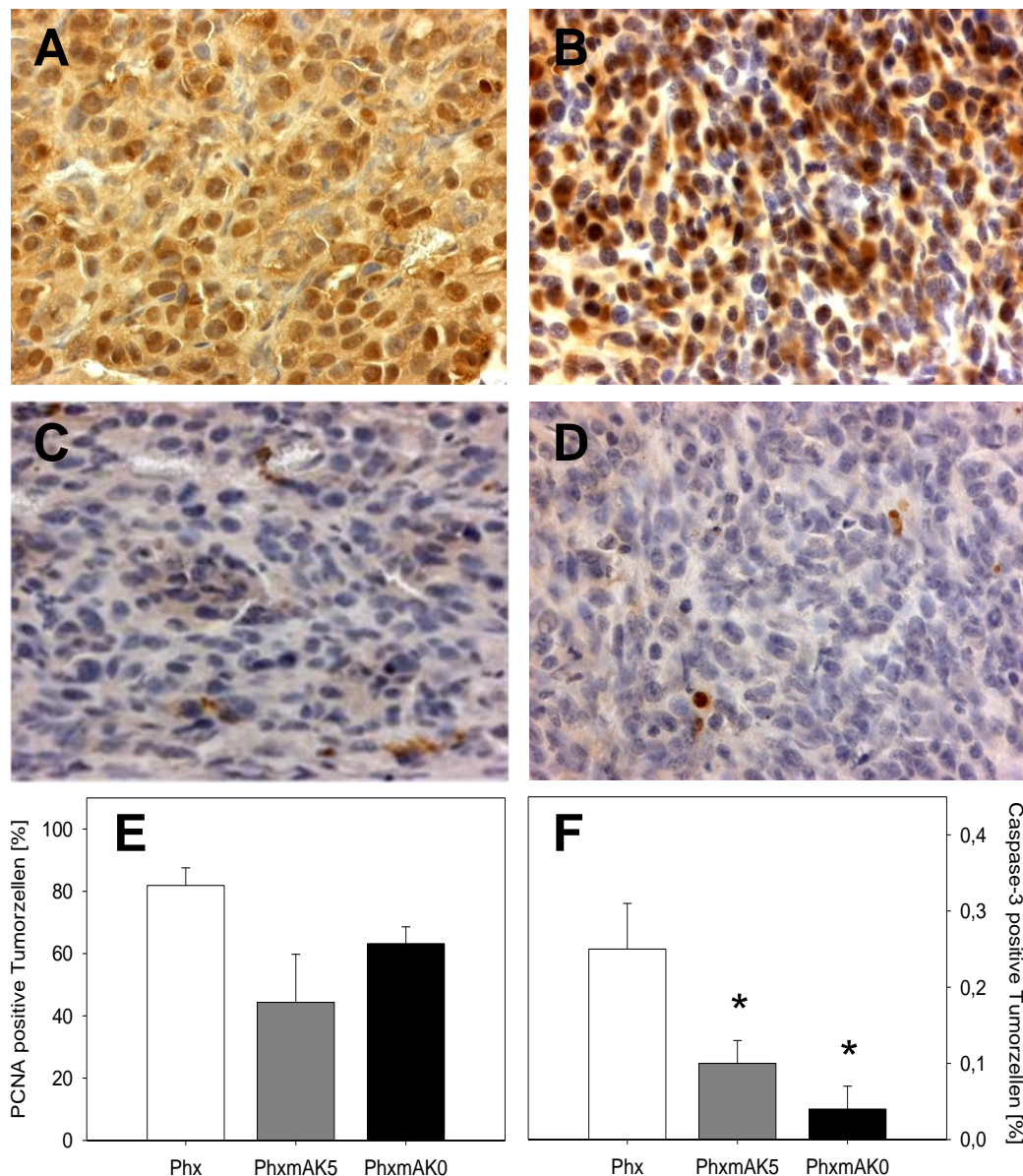


Abbildung 13: Proliferation und Apoptose

PCNA (A, PHx und B, PHxmAK5) und Caspase-3 (C, PHx und D, PHxmAK0) Immunohistochemie von Tumoren am Tag 14 nach Implantation. (A) und (C) zeigt Tiere der Kontrollgruppe PHx, (B) Tiere bei denen die anti-MIP-2 Behandlung an Tag 5 begonnen wurde, (D) Tiere bei denen die anti-MIP-2 Therapie bereits an Tag 0 begonnen wurde. Die quantitative Analyse der PCNA-positiven Zellen wird in E dargestellt. Die Analyse der Caspase-3 exprimierenden Tumorzellen (F) zeigte eine geringe Rate an apoptotischen Zellen in der Kontrollgruppe (PHx). Beide anti-MIP-2 Gruppen zeigten eine statistisch signifikant verminderte Anzahl apoptotischer Zellen gegenüber der Kontrollgruppe PHx. Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$ vs. PHx.

Die CXCR-2 Immunhistochemie (Abbildung 14) zeigt die Anfärbung der Rezeptoren auf Tumorzellen in der Kontrollgruppe (PHx). Die quantitative Analyse der CXCR-2 Expression in Tumoren der mit anti-MIP-2 Antikörper behandelten Tiere zeigte einen signifikanten ($p < 0,05$) Abfall der CXCR2-positiven Zellen in beiden Behandlungsgruppen. Dieser Befund zeigt keinen Unterschied zwischen Tumorrand (Abbildung 14) und Tumorzentrum (Daten nicht gezeigt).

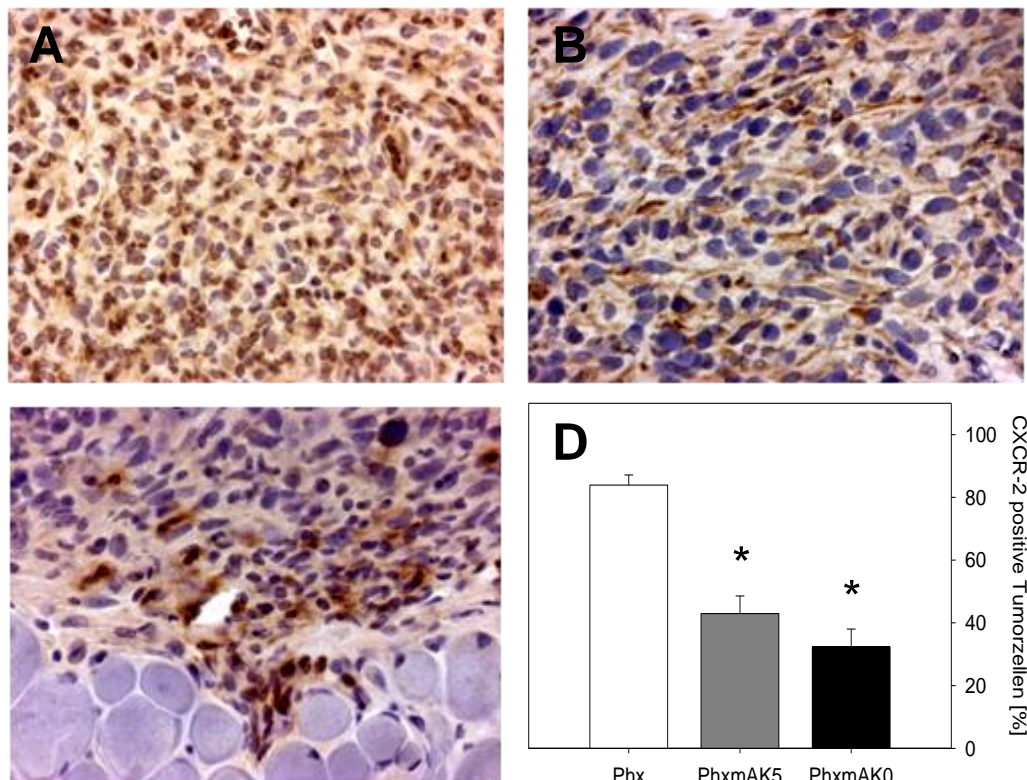


Abbildung 14: CXCR2 Expression

Immunhistochemie der CXCR-2 Expression von Tumorzellen am Tag 14 nach Tumorzellimplantation in der Kontrollgruppe (A, PHx) und in Tumoren mit anti-MIP-2 Behandlung ab Tag 5 (B, PHxmAK5) oder ab Tag 0 (C, PHxmAK0). Die quantitative Analyse (D) zeigte >80% CXCR-2 Expression in Tumoren der Kontrollgruppe (PHx). Die CXCR-2 Expression war in den Tumoren mit anti-MIP-2 Behandlung, signifikant vermindert. Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. PHx.

5. Diskussion

5.1. Relevanz der Tierversuche und des Tumormodells in der Maus

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse eines experimentellen Tumormodells an Mäusen auf den Menschen muss wiederholt kritisch diskutiert werden. Bei der CT26-GFP Tumorzelllinie und den damit verbundenen Experimenten handelt es sich um ein weit verbreitetes, gut standardisiertes und akzeptiertes Modell eines kolorektalen Karzinoms (Kollmar O et al., 2006[A, B]; Topf N et al., 1998; Weber SM et al., 1999; Chen SH et al., 2000; Hirschowitz EA et al., 1999; Nakanishi K et al., 2002; Huang H et al., 1996; Caruso M et al., 1996; Kuo TH et al., 1995; Kuriyama S et al., 1999), welches das Tumorwachstum und die Tumormetastasierung in Mäusen in einer dem Menschen vergleichbaren Weise zeigt. Mit diesem Modell wurden die Immunantwort und mögliche Ansätze einer gegen den Tumor gerichteten Immuntherapie (Weber SM et al., 1999; Chen SH et al. 2000; Hirschowitz EA et al., 1999; Huang H et al., 1996; Caruso M et al., 1996; Rabau M et al., 1994; Saffran DC et al., 1998; Ali S et al. 2004) ebenso analysiert wie die Mechanismen der Tumor-Stroma Interaktion (Kubota T et al., 2004) und die Adhäsion zwischen Tumorzelle und extrazellulärer Matrix (Lee JH et al. 2003). Aus diesem Grunde ist das genutzte Tumormodell mit der CT26-GFP Zelllinie als ein Modell anzusehen, welche die von menschlichen kolorektalen Karzinomen bekannten Konditionen in einer adäquaten Art und Weise widerspiegelt.

Zur Diskussion steht desweiteren die extrahepatische Implantation der Tumorzellen, welche nicht dem Mechanismus entspricht, auf dem sich Metastasen im Menschen in extrahepatisches Gewebe absiedeln. Jedoch ahmt das hierbei benutzte Modell ab dem Zeitpunkt des Anwachsens und dem Beginn der Angiogenese eng das in vivo Tumorwachstum im menschlichen Gewebe nach. Obwohl dieses Modell also nicht erlaubt den Weg der Metastasierung zu studieren, gibt es die Möglichkeit die Prozesse der Angiogenese und des Tumorwachstums der Metastase zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurde dieses Tumormodell vielfach genutzt und konnte zum wesentlichen Verständnis der Tumorgenese beitragen (Brown EB et al., 2001; Jain RK et al., 1997; Vajkoczy P et al., 2002; Erber R et al., 2004; Kollmar O et al., 2010; Rupertus K et al., 2009).

Die direkte Applikation von MIP-2 in die Rückenhautkammer und damit auf den Tumor selber ist ein weiterer Punkt, der die klinische Situation nicht eins zu eins wiedergibt; trotzdem muss dieser Ansatz als zulässig angesehen werden, um die

Rolle von MIP-2 in der Tumorentstehung zu studieren. Die direkte Konfrontation des Tumors mit einem Botenstoff ist nicht nur in der hier vorliegenden Arbeit benutzt worden, sondern Teil aller in vitro Studien zum Verhalten von Tumorzellen auf Mediatoren. Diesen in vitro Modellen fehlt hingegen die Blutversorgung und damit die Exposition und Interaktion des Tumors gegenüber Blutzellen, wie Leukozyten und Thrombozyten sowie die Wechselwirkung mit darunterliegendem Gewebe und damit mit Zellen wie Makrophagen und Endothelzellen. Trotz dieser Nachteile sind diese in vitro Ansätze allgemein akzeptierte Modelle zum Studium der Mechanismen der Tumorentstehung. Aus diesem Grunde ist die direkte topische Applikation des Mediators MIP-2, in diesem vorliegenden in vivo Modell zulässig.

Die Applikation des Antikörpers erfolgte in der hier vorliegenden Studie über das Peritoneum der Maus. Der zurzeit gängige Applikationsweg von Antikörpern in der Anti-Tumorthherapie wie z.B. Bevacizumab (Avastin®) ist intravenös, so dass das Therapeutikum den Tumor über das Blutgefäßsystem erreicht. Aus der Peritonealdialyse ist die Wechselwirkung zwischen Peritoneum und Blutkreislauf allgemein bekannt und erforscht. Da es schwierig ist, im Mausmodell das Therapeutikum intravenös zu verabreichen, was fast ausschließlich nur über die Schwanzvene erfolgen kann, ist die hier genutzte peritoneale Injektion des Antikörpers als geeigneter Ansatz zu betrachten, da der Antikörper über das Peritoneum in den Blutkreislauf gelangt.

5.2. MIP-2 - Wachstum etablierter extrahepatischer Tumoren

In der vorliegenden Arbeit steigerte MIP-2 signifikant das Tumorstadium der extrahepatisch etablierten Tumoren im Mausmodell. Dies geschah jedoch ohne eine Steigerung der Angiogenese der Tumoren und auch ein vergrößerter Durchmesser oder eine erhöhte Permeabilität der Tumorgefäße konnten nicht beobachtet werden. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu vorausgegangenen Studien, die zeigen konnten, dass MIP-2 abhängig von der Dosis die Bildung von neuen Blutgefäßen während der Tumorentwicklung in der Leber begünstigte (Kollmar O et al., 2006[B]). Die Tumorangioese wird vor allem durch Hypoxämie initiiert, die auftritt, wenn die Tumorzellen ohne ausreichende Gefäßversorgung sind. MIP-2 wirkt dieser Hypoxämie entgegen, indem es die Vaskularisation sich entwickelnder Tumoren verstärkt. Dies geschieht durch die von MIP-2 verursachte Steigerung der Ausschüttung von VEGF (Kollmar O et al., 2006[B]; Liss C et al., 2001; Scapini P et al., 2004). VEGF ist als potenter Mediator für neue Blutgefäßformationen bekannt

(Plate KH et al., 1992) und bedingt die Tumorinvasivität (Wang S et al., 2008; Kanda M et al., 2008). VEGF ist in der Lage eine Vasodilatation besonders in ischämischem Gewebe zu bewirken (Takeshita S et al., 1998) und als Permeabilitätsfaktor für Endothelzellen und neu geformte Mikrogefäße zu agieren (Hippenstiel S et al., 1998). Das Fehlen dieser VEGF-bedingten Veränderungen an den extrahepatisch etablierten Tumoren in der vorliegenden Arbeit lässt vermuten, dass MIP-2 in bereits etablierten Tumoren im Gegensatz zu sich noch entwickelnden Tumoren keine gesteigerte VEGF- Ausschüttung verursacht. Den Grund für diese ausbleibende Steigerung der Tumorangiogenese konnte die vorliegende Arbeit nicht liefern, weshalb verschiedene Erklärungsansätze diskutiert werden müssen. Die unkontrollierte Angiogenese durch MIP-2 im anfänglichen Stadium des Tumorwachstums war bei Kollmar et al. durch die hypoxämischen Grundvoraussetzungen bedingt (Kollmar O et al., 2006[B]). Im Gegensatz zu sich gerade erst entwickelnden Tumoren lag bei dem in der vorliegenden Arbeit benutzten Modell keine hypoxämische Ausgangssituation vor. Dies könnte erklären, warum MIP-2 das bereits bestehende mikrovaskuläre Netzwerk der extrahepatischen Metastasen der vorliegenden Studie nicht beeinträchtigte. Der von Kollmar et al. beschriebene angiogene Effekt wurde desweiteren in einem Modell mit intrahepatischer Tumorentwicklung beschrieben, während das Fehlen einer gesteigerten Angiogenese in der vorliegenden Arbeit in einer extrahepatisch gewachsenen Tumormetastase beobachtet wurde. Der von Tumoren stammende Wachstumsfaktor TGF- β 1 aktiviert tumorassoziierte Makrophagen, welche über die Sekretion von TNF- α und Interleukin-1 die Ausschüttung von MIP-2 und VEGF bewirken (Liss C et al., 2001). Im Lebergewebe unterstützt die große Anzahl an Kupfferzellen, welche bewegliche Makrophagen sind, die Aktion der tumorassoziierten Makrophagen und beschleunigt damit den Prozess der Angiogenese. Die Kupfferzellen sind aber auch direkt an der Tumorangiogenese beteiligt, da sie dazu befähigt sind selbst VEGF in größeren Mengen zu produzieren (Mochida S et al., 1998). Diese Überlegungen werden durch experimentelle Daten unterstützt, die zeigen, dass die Blockade der Kupfferzellen das Metastasenwachstum reduziert (Sturm JW et al., 2003). Es muss also angenommen werden, dass MIP-2 im Lebergewebe durch die Interaktion mit den Kupfferzellen pro-angiogen wirkt, während dieser pro-angiogene Effekt im extrahepatischen Gewebe, dem größere Mengen an Makrophagen fehlen, nicht beobachtet werden

konnte. Das Tumorwachstum in der vorliegenden Arbeit war also nicht durch eine Steigerung oder Beschleunigung der Tumorangiogenese bedingt.

In der vorliegenden Arbeit resultierte die MIP-2 Behandlung in größeren Tumoren mit kleinerer funktioneller Kapillardichte verglichen zur PBS-behandelten Kontrollgruppe. Diese geringere Vaskularisation beeinflusste aber nicht das Zellüberleben, was sich in einer unveränderten Apoptose- und Nekroserate nach MIP-2 Behandlung widerspiegelte. Dies lässt darauf schließen, dass die PBS-behandelten Tumoren eine über das notwendige Maß hinausgehende Blutversorgung erhielten und dass die Gefäßdichte der MIP-2 behandelten Tumoren als ausreichend betrachtet werden kann. Alternativ ist es möglich, dass MIP-2 eine Ischämietoleranz induzierte, welche den Tumorzellen ein Überleben und Wachstum auch unter reduzierten Blutfluss-Bedingungen ermöglichte.

Ein weiterer Erklärungsansatz des gesteigerten Tumorwachstums nach MIP-2 Applikation liegt in der Expression des CXCR2-Rezeptors. Bei den in dieser Arbeit extrahepatisch gewachsenen CT26-GFP Tumoren der mit PBS behandelten Kontrollgruppe, zeigten etwa 70% der Tumorzellen am Rand eine Expression des CXCR2-Rezeptors. Im Tumorzentrum exprimierten hingegen nur 30% der Tumorzellen den Rezeptor. Da die Aktivität des Tumorwachstums in großem Maße am Tumorrand, aber nicht im Tumorzentrum stattfand, ist die signifikant vermehrte Expression des CXCR-2 Rezeptors am Tumorrand ein Hinweis darauf, dass dieser Chemokinrezeptor eine Rolle im Tumorwachstum spielt. Die Tatsache, dass ein Chemokinrezeptor Tumorwachstum verursachen kann ist keine neue Erkenntnis. Zeelenberg et al. konnten bereits vor einigen Jahren experimentell zeigen, dass der Chemokinrezeptor CXCR-4 das Größenwachstum von Mikrometastasen eines Kolonkarzinoms veranlasst (Zeelenberg IS et al., 2003). Auch für das CXCL1/CXCR2 System konnte bereits gezeigt werden, daß dessen Expression mit Tumorzellproliferation und metastatischem Potential assoziiert ist (Li A et al., 2004). Rubie et al konnten gesteigerte CXCR2 Expressions Level in kolorektalem Tumorgewebe und kolorektalen Lebermetastasen nachweisen (Rubie C et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde durch MIP-2 die Expression des CXCR2-Rezeptors in den extrahepatisch etablierten Tumoren im Tumorzentrum auf beinahe 70% gesteigert. Die Expression am Tumorrand wurde durch die Applikation von MIP-2 nicht beeinflusst. Dies entspricht am ehesten der Tatsache, dass auch ohne die Applikation von MIP-2 in der Kontrollgruppe am Tumorrand bereits 70% der Zellen eine Expression des CXCR2-Rezeptors zeigten und dies wahrscheinlich einer

maximalen Expression im Tumor entspricht. Solide Tumoren könnten bei etwa 70% CXCR2-Expression tatsächlich maximal ausgelastet sein, da neben den eigentlichen CT26-GFP Klonzellen die Tumoren aus einer Vielzahl anderer Zellen, darunter Endothelzellen, Fibroblasten und Stromazellen bestehen, die nicht notwendigerweise einen Chemokin-Rezeptor exprimieren (Kollmar O et al., 2006[B]). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass in diesem Maus-Modell die allgemein gesteigerte Expression von CXCR2 nach MIP-2-Exposition mit einer gesteigerten Zellproliferation, Tumorwachstum und Tumorinvasivität durch die benachbarte Muskelschicht assoziiert war. Daher scheint die gesteigerte in vivo Expression von CXCR2 den Aktions-Mechanismus des durch MIP-2 gesteigerten Tumorwachstums wiederzugeben.

5.3. MIP-2 - Wachstum extrahepatischer Tumoren nach Leberresektion

Der Leberresektion folgt eine schnelle Regeneration mit einem schnellen Wachstum der verbleibenden Leber um die Funktionsfähigkeit zu erhalten. Einige Studien deuteten darauf hin, dass an diesem hepatischen Regenerationsprozess das CXCR2/MIP-2 System beteiligt ist (Ren X et al., 2003, Colletti LM et al., 1998). In einer dieser Studien konnten Ren et. al. zeigen, dass die Blockade des CXCR2-Rezeptors die Regeneration der verbleibenden Leber inhibierte, wohingegen eine selektive Neutralisation des Chemokins MIP-2 durch einen MIP-2 Antikörper die Regeneration nicht beeinflusste, was sich an einer unveränderten Rate des Lebergewichts zum Körpergewicht zeigte (Ren X et al., 2003). Der Umstand, dass nach einer Leberresektion von kolorektalen Metastasen in über zweidrittel der Patienten erneut Metastasen auftreten (Fong Y et al., 1999) lässt vermuten, dass nicht nachweisbare residuale Mikrometastasen in Patienten, welche sich einer kurativen Leberresektion unterziehen, verbleiben (Delman KA et al., 2002). Auch das Tumorwachstum an extrahepatischen Orten ist während der Regeneration der Leber nach einer Leberresektion gesteigert (Schindel DT et al., 1997). Kollmar et al konnten bereits zeigen, dass MIP-2 in der verbleibenden Leber eine signifikante, durch die Leberresektion bedingte Beschleunigung des metastatischen Tumorwachstums bewirkt (Kollmar O et al., 2006[A]). Welche Rolle MIP-2 bei dem beschleunigten Wachstum von Metastasen nach Leberresektion an extrahepatischen Orten spielt war bisher nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Neutralisation von MIP-2 das Anwachsen

kolorektaler CT26-GFP Krebszellen an extrahepatischen Orten signifikant verzögert, was sich in einem reduzierten Tumorgößenwachstum während der ersten Tage nach der Leberresektion widerspiegelte. Interessanterweise konnte diese Neutralisation von MIP-2 das Tumorwachstum zu einem späteren Zeitpunkt nicht verhindern. Es kam im späteren Verlauf sogar zu einer kompensatorischen Stimulation des Tumorwachstums um der Wachstumsverzögerung während der Frühphase entgegenzuwirken. Dies zeigte sich an einer signifikant gesteigerten Wachstumsrate und signifikant vermehrter Tumorzellmigration und Neovaskularisation verglichen mit der Kontrollgruppe.

Die Neutralisation von MIP-2 bereits mit dem Tag der Leberresektion beginnend hatte keinen Einfluss auf die Tumorzellproliferation, sodass die beobachtete kompensatorische Wachstumssteigerung nicht durch eine Steigerung der Tumorzellproliferation bedingt war. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass dieser Effekt eher der deutlich verringerten Apoptoserate zuzuschreiben ist. Dies konnte an einer 85%igen Reduktion an Tumorzellapoptose am Tag 14 nach Leberresektion der MIP-2 Versuchsgruppe PHxmAK0, verglichen zur unbehandelten, Kontrollgruppe gezeigt werden. Einige Studien postulieren, dass die Expression des CXCR-2 Rezeptors für die proliferative Wirkung der Chemokine an Tumorzellen notwendig ist (Kollmar O et al., 2006[B]; Li A et al., 2004; Zeelenberg IS et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit reduzierte die anti-MIP-2 Therapie, egal ob an Tag 0 oder an Tag 5 begonnen, die Expression des CXCR-2 Rezeptors verglichen zur Kontrollgruppe PHx. Diese Tatsache unterstützt die Vermutung, dass die kompensatorische Wachstumssteigerung nach der initialen Verzögerung des Anwachsens der Tumorzellen der bereits an Tag 0 therapierten Tiere nicht durch einen Anstieg der Proliferation, sondern durch eine Reduktion des apoptotischen Zelltodes bedingt ist.

Die oben beschriebenen Beobachtungen zeigten sich nur, wenn die anti-MIP-2 Therapie am Tag der Leberresektion begonnen wurde. Eine Therapie zu einem späteren Zeitpunkt konnte das Wachstum bereits etablierter extrahepatischer Metastasen nicht beeinflussen. Das Ausbleiben dieser Wachstumshemmung wurde beobachtet, obwohl es zu einer ca 60%igen Reduktion des apoptotischen Zelltodes gegenüber der Kontrollgruppe kam. Die Reduktion der Caspase-3 Expression und damit der Apoptoserate war verbunden mit einer etwa 50%igen Reduktion der PCNA Expression, was vermuten lässt, dass die Reduktion der Apoptose durch eine Reduktion der Zellproliferation aufgewogen wurde.

Chemokine sind als potente Mediatoren der Tumorzellmigration bekannt. Kollmar et al. konnten in in-vitro Studien bereits einen dosis-abhängigen Anstieg der Tumorzellmigration als Antwort auf gesteigerte MIP-2 Werte zeigen, was eine durch MIP-2 verursachte Steigerung des Tumorstwachstums initiierte (Kollmar O et al., 2006[B]). Überraschenderweise zeigte in der vorliegenden Arbeit auch die Neutralisation von MIP-2 einen stimulierenden Effekt auf die Migration der Tumorzellen. Dies mag daran liegen, dass die durch anti-MIP-2 verursachte Wachstumsverzögerung dem Bestreben des Tumors zu wachsen entgegentläuft. Die Tumoren reagierten mit einer kompensatorischen Stimulation des Tumorstwachstums, welche mit einer gesteigerten Empfindsamkeit gegenüber anderen Chemokinen und Cytokinen, die nach der Leberresektion im Rahmen der Leberregeneration freigesetzt werden einherging (Kimura F et al., 2006; Kim J et al., 2006). Interessanterweise inhibierte eine später begonnene anti-MIP-2 Behandlung die Tumorzellmigration. Diese Behandlung resultierte nicht in einer Verzögerung des Tumorzellanzwachsens und damit auch nicht in einer kompensatorischen Wachstumssteigerung. Die Neutralisation von MIP-2 ist hierbei wahrscheinlich analog zu vorherigen in vitro Experimenten für die Reduktion der Zellmigration in vivo verantwortlich (Kollmar O et al., 2006[B]).

CXC-Chemokine sind in die Angiogenese involviert. Scapini et al. konnten in einem in vivo Experiment zeigen, dass MIP-2 in Entzündungen durch die Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A Angiogenese induziert (Scapini P et al., 2004). Die exogene Applikation von MIP-2 bewirkt durch eine Induktion von Tumorgefäßen ein beschleunigtes Anwachsen intrahepatischer Metastasen eines Kolonkarzinoms wie Kollmar et al zeigen konnten (Kollmar O et al., 2006[B]). Die Arbeitsgruppe um Kollmar zeigte auch, dass durch eine Hemmung des endogen produzierten MIP-2 während der frühen Phase des intrahepatischen Anwachsens der Tumorzellen eine signifikante Reduktion der durch die Leberresektion bedingten Neovaskularisation und Tumorentwicklung erreicht werden kann (Kollmar O et al., 2006[A]). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Neutralisation von MIP-2 am Tag der Tumorimplantation und Leberresektion (Tag 0) eine geringe Reduktion der Angiogenese während der frühen Phase, in der das Anwachsen der Tumorzellen verzögert ist, bewirkt. Die spätere Phase, die Phase des kompensatorischen Wachstums, war jedoch mit einer gesteigerten Angiogenese assoziiert. Darauf deutete eine signifikant gesteigerte Kapillardichte verglichen zu den beiden anderen Gruppen hin. Dem Anstieg der Kapillardichte in Tieren, bei

denen die anti-MIP-2 Therapie bereits am Tag 0 begann, ging ein Anstieg petechialer Blutungen voraus. Der kompensatorische Anstieg der Neovaskularisation in dieser Gruppe ist daher am ehesten durch Wachstumsfaktoren wie VEGF verursacht, die eine Änderung der Permeabilität der Mikrogefäße bewirkten (Plate KH et al., 1992; Takeshita S et al., 1998; Hippenstiel S et al., 1998).

5.4. Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit in einem Mausmodell zeigen, dass MIP-2 das Wachstum von etablierten extrahepatischen Metastasen eines kolorektalen Karzinoms beschleunigt. Dies geschieht durch eine Steigerung der Zellproliferation sowie der Expression des CXCR-2 Rezeptors, ist jedoch nicht durch eine verstärkte oder beschleunigte Neoangiogenese bedingt.

Durch die Neutralisation von MIP-2 zu einem frühen Zeitpunkt nach einer Leberresektion kann das Tumorwachstum nur bedingt gehemmt werden. Für das weitere Wachstum bereits etablierter Metastasen ist MIP-2 nicht notwendig. Interessanterweise wird das initial gehemmte Tumorwachstum während der späteren Phase des metastatischen Wachstums kompensatorisch gesteigert. Diese Steigerung geht mit einer vermehrten Angiogenese und einer Reduktion des apoptotischen Tumorzelltodes einher.

Aus diesem Grund erscheint der MIP-2/CXCR-2 Signalweg ein erfolgsversprechendes Ziel für die Behandlung von Mikrometastasen nach Leberresektion zu sein. Zur Prävention des Anwachsens von Tumorzellen an extrahepatischen Stellen müssen jedoch weitere Untersuchungen zeigen, wie das durch Steigerung der Angiogenese bedingte kompensatorische Wachstum später verhindert werden kann.

6. Literaturverzeichnis

1. Abdalla EK, Adam R, Bilchik AJ, Jaeck D, Vauthey JN, Mahvi D (2006) Improving resectability of hepatic colorectal metastases: expert consensus statement. *Ann Surg Oncol* 13:1271-1280.
2. Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, Pollock R, Broglio KR, Hess K, Curley SA (2004) Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 239:818-827.
3. Adam R, Delvart V, Pascal G, Valeanu A, Castaing D, Azoulay D, Giacchetti S, Paule B, Kunstlinger F, Ghémard O, Levi F, Bismuth H (2004) Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann Surg* 2004; 240:644–657.
4. Ali S, Ahmad M, Lynam J, Rees RC, Brown N (2004) Trafficking of tumor peptide-specific cytotoxic T lymphocytes into the tumor microcirculation. *Int J Cancer* 110:239–244.
5. Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ, Glass M, Burdick MD, Strieter RM (1996) Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. *J Clin Invest* 97:2792-2802.
6. Armstrong DA, Major JA, Chudyk A, Hamilton TA (2004) Neutrophil chemoattractant genes KC and MIP-2 are expressed in different cell populations at sites of surgical injury. *J Leukoc Biol* 75:641-648.
7. Balbay MD, Pettaway CA, Kuniyasu H, Inoue K, Ramirez E, Li E, Fidler IJ, Dinney CP (1999) Highly metastatic human prostate cancer growing within the prostate of athymic mice overexpresses vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 5:783-789.
8. Bergers G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3:401-410.
9. Black WC, Welch HG (1993) Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy. *N Engl J Med* 328:1237-1243.
10. Brew R, Erikson JS, West DC, Kinsella AR, Slavin J, Christmas SE (2000) Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine* 12:78-85.

11. Brown EB, Campbell RB, Tsuzuki Y, et al. (2001) In vivo measurement of gene expression, angiogenesis and physiological function in tumors using multiphoton laser scanning microscopy. *Nat Med* 7:864–868.
12. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E (1998) Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394:485-490.
13. Carmeliet P (1999) Controlling the cellular brakes. *Nature* 401:657- 658.
14. Carpizo DR, Are C, Jarnagin W, DeMattea R, Fong Y, Gönen M, Blumgart L, D'Angelica M (2009) Liver resection for metastatic colorectal cancer in patients with concurrent extrahepatic disease: Results in 127 patients treated at a single center. *Ann Surg Oncol* 16:2138-3146.
15. Caruso M, Pham-Nguyen K, Kwong YL, Xu B, Kosai KI, Finegold M, Woo SL, Chen SH (1996) Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for metastatic colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11302–11306.
16. Chen SH, Pham-Nguyen KB, Martinet O, Huang Y, Yang W, Thung SN, Chen L, Mittler R, Woo SL (2000) Rejection of disseminated metastases of colon carcinoma by synergism of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation. *Mol Ther* 2:39–46.
17. Choti MA, Sitzmann JV, Tiburi MF, Sumetchotimetha W, Rangsri R, Schulick RD, Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL (2002) Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg* 235:759-766.
18. Christophi C, Harun N, Fifis T (2008) Liver Regeneration an Tumor Stimulation- A Review of Cytokine and Angiogenic Factors. *J Gastrointest Surg* 12:966-980.
19. Colletti LM, Green M, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM (1998) Proliferative effects of CXC chemokines in rat hepatocytes in vitro and in vivo. *Shock* 10:248-257.
20. De Jong KP, Lont HE, Bijma AM, Brouwes MA, De Vries EG, Van Veen ML, Marquet RL, Slooff MJ, Terpstra OT (1995) The effect of partial hepatectomy on tumor growth in rats: in vivo and in vitro studies. *Heptology* 22:1263-1272.
21. Delman KA, Zager JS, Bennett JJ, Malhotra S, Ebright MI, McAuliffe PF, Halterman MW, Federoff HJ, Fong Y (2002) Efficacy of multiagent herpes

- simplex virus amplicon-mediated immunotherapy as adjuvant treatment for experimental hepatic cancer. *Ann Surg* 236:337-342.
22. Drixler TA, Borel Rinkes IHM, Ritchie ED, van Vroonhoven TJMV, Gebbink MFBG, Voest EE (2000) Continuous administration of angiostatin inhibits accelerated growth of colorectal liver metastases after partial hepatectomy. *Cancer Res* 60:1761-1765.
 23. Elias D, Liberale G, Vernerey D, Pocard M, Ducreux M, Boige V, Malka D, Pignon JP, Lasser P (2005) Hepatic and extrahepatic colorectal metastases: when resectable, their localization does not matter, but their total number has a prognostic effect. *Ann Surg Oncol* 12:900-909.
 24. Erber R, Thurnher A, Katsen AD, Groth G, Kerger H, Hammes HP, Menger MD, Ullrich A, Vajkoczy P (2004) Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J* 18:338–340.
 25. Fahey TJ 3rd, Sherry B, Tracey KJ, van Deventer S, Jones WG 2nd, Minei JP, Morgello S, Shires GT, Cerami A (1990) Cytokine production in a model of wound healing: the appearance of MIP-1, MIP-2, cachectin/TNF and IL-1. *Cytokine* 2:92-99.
 26. Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186.
 27. Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med* 1:27-31.
 28. Folkman J. (2001) Angiogenesis. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds) *Harrison's Textbook of Internal Medicine* 15th edn. McGraw- Hill, New York, pp 517-530.
 29. Fong Y, Fortner J, Sin RL, Brennan MF, Blumgart LH (1999) Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 230:309-318.
 30. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B (1998) Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 94:715-725.
 31. Hanahan D, Folkman J (1996) Parameters and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353-364.
 32. Hanahan D, Weinberg R (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.

33. Haraguchi M, Komuta K, Akashi A, Matsuzaki S, Furui J, Kanematsu T. (2002) Elevated IL-8 levels in the drainage vein of resectable Dukes- C colorectal cancer indicate high risk for developing hepatic metastasis. *Oncol Rep* 9:159-165.
34. Hippenstiel S, Krull M, Ikemann A, Risau W, Clauss M, Suttorp N (1998) VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. *Am J Physiol* 274:678–684.
35. Hirschowitz EA, Naama HA, Evoy D, Lieberman MD, Daly J, Crystal RG (1999) Regional treatment of hepatic micrometastasis by adenovirus vector-mediated delivery of interleukin-2 and interleukin-12 cDNAs to the hepatic parenchyma. *Cancer Gene Ther* 6:491–498.
36. Homey B, Muller A, Zlotnik A (2002) Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nat Rev Immunol* 2:175-184.
37. Huang H, Chen SH, Kosai K, Finegold MJ, Woo SL (1996) Gene therapy for hepatocellular carcinoma: long-term remission of primary and metastatic tumors in mice by interleukin-2 gene therapy in vivo. *Gene Ther* 3:980–987.
38. Huang S, Mills L, Mian B, Tellez C, McCarty M, Yang XD, Gudas JM, Bar-Eli M (2002) Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. *Am J Pathol* 161:125-134.
39. Jain RK, Schlenger K, Hockel M, Yuan F (1997) Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat Med* 3:1203–1208.
40. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ (2009) Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59:225-249.
41. Kanda M, Nomoto S, Nishikawa Y, Sugimoto H, Kanazumi N, Takeda S, Nakao A (2008) Correlations of the expression of vascular endothelial growth factor B and its isoforms in hepatocellular carcinoma with clinic-pathological parameters. *J Surg Oncol* 98:190-196.
42. Kerbel RS (2000) Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 21:505-515.
43. Kim J, Mori T, Chen SL, Amersi FF, Martinez SR, Kuo C, Turner RR, Ye X, Bilchik AJ, Morton DL, Hoon DS (2006) Chemokine receptor CXCR4 expression in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome. *Ann Surg* 244:113-120.

44. Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Nozawa S, Furukawa K, Mitsuhashi N, Sawada S, Takeuchi D, Ambiru S, Miyazaki M (2006) Circulating cytokines, chemokines, and stress hormones are increased in patients with organ dysfunction following liver resection. *J Surg Res* 133:102-112.
45. Kollmar O, Menger MD, Schilling MK (2006[A]) Macrophage inflammatory protein-2 contributes to liver resection-induced acceleration of hepatic metastatic tumor growth. *World J Gastroenterol* 12:858-867.
46. Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, Nickels RM, Haberl GCY, Tilton B, Menger MD, Schilling MK (2010) CXCR4 and CXCR 7 regulate angiogenesis and CT26.WT tumor growth independent from SDF-1. *Int J Cancer* 126:1302-1315.
47. Kollmar O, Scheuer C, Menger MD, Schilling MK (2006[B]) Macrophage inflammatory protein-2 promotes angiogenesis, cell migration, and tumor growth in hepatic metastasis. *Ann Surg Oncol* 13:263–275.
48. Kubota T, Fujiwara H, Amaike H, Takashima K, Inada S, Atsuji K, Yoshimura M, Matsumoto K, Nakamura T, Yamagishi H (2004) Reduced HGF expression in subcutaneous CT26 tumor genetically modified to secrete NK4 and its possible relation with antitumor effects. *Cancer Sci* 95:321–327.
49. Kuo TH, Kubota T, Watanabe M, Furukawa T, Teramoto T, Ishibiki K, Kitajima M, Moossa AR, Penman S, Hoffman RM (1995) Liver colonization competence governs colon cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:12085–12089.
50. Kuriyama S, Yamazaki M, Mitoro A, Tsujimoto T, Kikukawa M, Tsujinoue H, Nakatani T, Toyokawa Y, Yoshiji H, Fukui H et al. (1999) Hepatocellular carcinoma in an orthotopic mouse model metastasizes intrahepatically in cirrhotic but not in normal liver. *Int J Cancer* 80:471–476.
51. Labow DM, Buell JE, Yoshida A, Rosen S, Posner MC (2002) Isolated pulmonary recurrence after resection of colorectal hepatic metastases—is resection indicated? *Cancer J* 8:342-347.
52. Lee JH, Seo YW, Park SR, Kim YJ, Kim KK (2003) Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression. *Cancer Res* 63:7247–7255.
53. Li A, Varney ML, Singh RK (2004) Constitutive expression of growth regulated oncogene (gro) in human colon carcinoma cells with different metastatic

- potential and its role in regulating their metastatic phenotype. *Clin Exp Metastasis* 21:571–579.
54. Liss C, Fekete MJ, Hasina R, Lam CD, Lingen MW (2001) Paracrine angiogenic loop between head-and-neck squamous-cell carcinomas and macrophages. *Int J Cancer* 93:781–785.
 55. Michalopoulos GK, DeFrances MC (1997) Liver regeneration. *Science* 276:60-66.
 56. Miller LJ, Kurtzman SH, Wang Y, Anderson KH, Lindquist RR, Kreutzer DL (1998) Expression of interleukin-8 receptors on tumor cells and vascular endothelial cells in human breast cancer tissue. *Anticancer Res* 18:77-81.
 57. Mizutani J, Hiraoka T, Yamashita R, Miyauchi Y (1992) Promotion of hepatic metastases by liver resection in the rat. *Br J Cancer* 65:794-797.
 58. Mochida S, Ishikawa K, Toshima K, Inao M, Ikeda H, Matsui A, Shibuya M, Fujiwara K (1998) The mechanisms of hepatic sinusoidal endothelial cell regeneration: a possible communication system associated with vascular endothelial growth factor in liver cells. *J Gastroenterol Hepatol* 13(Suppl):1–5.
 59. Mosher B, Dean R, Harkema J, Remick D, Palma J, Crockett E (2001) Inhibition of Kupffer cells reduced CXC chemokine production and liver injury. *J Surg Res* 99:201-210.
 60. Nakanishi K, Sakamoto M, Yasuda J, et al.(2002) Critical involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in anchorage-independent growth and hematogeneous intrahepatic metastasis of liver cancer. *Cancer Res* 62:2971–2975.
 61. Ness TL, Hogaboam CM, Strieter RM, Kunkel SL (2003) Immunomodulatory role of CXCR2 during experimental septic peritonitis. *J Immunol* 171:3775-3784.
 62. Ono M, Tanaka N, Orita K (1986) Complete regression of mouse hepatoma transplanted after partial hepatectomy and the immunological mechanism of such regression. *Cancer Res* 46:5049-5053.
 63. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. (1991) Properties of the novel proinflammatory supergene “intercrine” cytokine family. *Annu Rev Immunol* 9:617-648.
 64. Otto VI, Heinzel-Pleines UE, Gloor SM, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC (2000) sICAM-1 and TNF-alpha induce MIP-2 with distinct

- kinetics in astrocytes and brain microvascular endothelial cells. *J Neurosci Res* 60:733-742.
65. Peeters CF, Westphal JR, de Waal RM, Ruiter DJ, Wobbes T, Ruers TJ (2004) Vascular density in colorectal liver metastases increases after removal of the primary tumor in human cancer patients. *Int J Cancer* 112:554-559.
 66. Picardo A, Karpoff HM, Ng B, Lee J, Brennan MF, Fong Y (1998) Partial hepatectomy accelerates local tumor growth: potential roles of local cytokine activation. *Surgery* 124:57-64.
 67. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W (1992) Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 359:845–848.
 68. Rabau M, Kashtan H, Baron S, Yossiphov J, Skornik Y, Revel M, Eisenthal A (1994) Inhibition of CT-26 murine adenocarcinoma growth in the rectum of mice treated with recombinant human interleukin-6. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 15:257–264.
 69. Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS (2000) Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 5:24-33.
 70. Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL (1997) Expression of the angiogenic factors vascular endothelial growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor- β -1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* 57:963-969.
 71. Ren X, Carpenter A, Hogaboam C, Colletti L (2003) Mitogenic properties of endogenous and pharmacological doses of macrophage inflammatory protein-2 after 70% hepatectomy in the mouse. *Am J Pathol* 163:563-570.
 72. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg) (2008) Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage, Berlin.
 73. Rubie C, Kollmar O, Frick VO, Wagner M, Brittner B, Gräber S, Schilling MK (2008) Differential CXCR receptor expression in colorectal carcinomas. *Scand J Immunol* 68:635-644.
 74. Rupertus K, Dahlem C, Menger MD, Sachilling MK, Kollmar O (2009) Rapamycin inhibits hepatectomy-induced stimulation of metastatic tumor

- growth by reduction of angiogenesis, microvascular blood perfusion and tumor cell proliferation. *Ann Surg Oncol* 16:2629-2637.
75. Rupertus K, Kollmar O, Scheuer C, Junker B, Menger MD, Schilling MK (2007) Major but not minor hepatectomy accelerates engraftment of extrahepatic tumor cells. *Clin Exp Metastasis* 24:39-48.
 76. Saffran DC, Horton HM, Yankauckas MA, Anderson D, Barnhart KM, Abai AM, Hobart P, Manthorpe M, Norman JA, Parker SE (1998) Immunotherapy of established tumors in mice by intratumoral injection of interleukin-2 plasmid DNA: induction of CD8+ T-cell immunity. *Cancer Gene Ther* 5:321–330.
 77. Saijo Y, Tanaka M, Miki M, Usui K, Suzuki T, Maemondo M, Hong X, Tazawa R, Kikuchi T, Matsushima K, Nukiwa T (2002) Proinflammatory cytokine IL-1 beta promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: in vivo analysis of tumorstromal interaction. *J Immunol* 169:469-475.
 78. Scapini P, Morini M, Tecchio C, Minghelli S, Di Carlo E, Tanghetti E, Albin A, Lowell C, Berton G, Noonan DM, Cassatella MA (2004) CXCL1/macrophage inflammatory protein-2-induced angiogenesis in vivo is mediated by neutrophil-derived vascular endothelial growth factor-A. *J Immunol* 172:5034–5040.
 79. Schindel DT, Grosfeld JL. (1997) Hepatic resection enhances growth of residual intrahepatic and subcutaneous hepatoma, which is inhibited by octreotide. *J Pediatr Surg*. 32:995-997.
 80. Schramm R, Thorlacius H (2003) Staphylococcal enterotoxin B-induced acute inflammation is inhibited by dexamethasone: important role of CXC chemokines KC and macrophage inflammatory protein 2. *Infect Immun* 71:2542-2547.
 81. Schramm R, Thorlacius H (2004) Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation: inhibitory mechanisms of glucocorticoids. *Inflamm Res* 53:644-652.
 82. Sckell A, Safabakhsh N, Dellian M, Jain RK (1998) Primary tumor size-dependent inhibition of angiogenesis at a secondary site: an intravital microscopic study in mice. *Cancer Res*. 58:5866-5869.
 83. Slooter GD, Marquet RL, Jeekel J, Ijzermans JNM (1995) Tumour growth stimulation after partial hepatectomy can be reduced by treatment with tumour necrosis factor alpha. *Br J Surg* 82:129-132.

84. Statistisches Bundesamt (2009) Gesundheit. Todesursachen in Deutschland. Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen 2007. Fachserie 12 Reihe 4, Wiesbaden.
85. Steele G, Ravikumar TS (1989) Resection of hepatic metastases from colorectal cancer: biological perspectives. *Ann Surg* 210:127-138.
86. Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, Walz A, Opdenakker G, Van Damme J, Kunkel SL (1995) Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J Leukoc Biol* 57:752-762.
87. Sturm JW, Magdeburg R, Berger K, Petruch B, Samel S, Bönninghoff R, Keese M, Hafner M, Post S (2003) Influence of TNFA on the formation of liver metastases in a syngenic mouse model. *Int J Cancer* 107:11–21.
88. Takeda A, Stoeltzing O, Ahmad SA, Reinmuth N, Liu W, Parikh A, Fan F, Akagi M, Ellis LM (2002) Role of angiogenesis in the development and growth of liver metastasis. *Ann Surg Oncol* 9:610-616.
89. Takeshita S, Isshiki T, Ochiai M, Eto K, Mori H, Tanaka E, Umetani K, Sato T (1998) Endothelium-dependent relaxation of collateral microvessels after intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation* 98:1261–1263.
90. Topf N, Worgall S, Hackett NR, Crystal RG (1998) Regional 'pro-drug' gene therapy: intravenous administration of an adenoviral vector expressing the *E. coli* cytosine deaminase gene and systemic administration of 5-fluorocytosine suppresses growth of hepatic metastasis of colon carcinoma. *Gene Ther* 5:507–513.
91. Ueda T, Shimada E, Urakawa T (1997) Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin- 6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. *J Gastroenterol* 29:423-429.
92. Ueda T, Sakabe T, Oka M, Maeda Y, Nishida M, Murakami F, Maekawa T (2000) Levels of interleukin (IL)-6, IL-8, and IL-1 receptor antagonist in the hepatic vein following liver surgery. *Hepatogastroenterology* 47:1048-1051.
93. Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A, Heidenreich R, Erber R, Wunder A, Tonn JC, Menger MD, Breier G (2002) Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *J Clin Invest* 109:777–785.

94. Wang J, Mukaida N, Zhang Y, Ito T, Nakao S, Matsushima K (1997) Enhanced mobilization of hematopoietic progenitor cells by mouse MIP-2 and granulocyte colony-stimulating factor in mice. *J Leukoc Biol* 62:503-509.
95. Wang S, Liu H, Ren L, Pan Y, Zhang Y (2008) Inhibiting colorectal carcinoma growth and metastasis by blocking the expression of VEGF using RNA interference. *Neoplasia* 10:399-407.
96. Weber SM, Shi F, Heise C, Warner T, Mahvi DM (1999) Interleukin-12 gene transfer results in CD8-dependent regression of murine CT26 liver tumors. *Ann Surg Oncol* 6:186–194.
97. Xie K (2001) Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 4:375-391.
98. Xing Z, Jordana M, Kirpalani H, Driscoll KE, Schall TJ, Gauldie J (1994) Cytokine expression by neutrophils and macrophages in vivo: endotoxin induces tumor necrosis factor- α , macrophage inflammatory protein-2, interleukin-1 β , and interleukin-6 but not RANTES or transforming growth factor- β 1 mRNA expression in acute lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10:148-153.
99. Yamamoto J, Shimada K, Kosuge T, Yamasaki S, Sakamoto M, Fukuda H (1999) Factors influencing survival of patients undergoing hepatectomy for colorectal metastases. *Br J Surg* 86:332-337.
100. Yoshidome H, Ito H, Kimura F, Ambiru S, Shimizu H, Togawa A, Ohtsuka M, Kato A, Nukui Y, Miyazaki M. (2004) Surgical treatment for extrahepatic recurrence after hepatectomy for colorectal metastases *Hepatogastroenterology* 51:1805-1809.
101. Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E (2003) The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res* 63:3833–3839.

7. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in Kooperation mit dem Institut für Klinisch & Experimentelle Chirurgie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar (Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger) und der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg/Saar (Direktor: Prof. Dr. med M. K. Schilling) durchgeführt.

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Otto Kollmar, Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie der Universität des Saarlandes. Ich danke ihm für die Überlassung des Themas, die Anregungen während der Versuchsdurchführung und die kritische Diskussion der Daten. Die Unterstützung, die ich von ihm erfahren habe, trug wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit bei und hat meine wissenschaftliche Entwicklung prägend beeinflusst.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. M. D. Menger und Herrn Prof. Dr. med. M. K. Schilling, für die freundliche Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente und für die Hilfe bei der Interpretation der Daten. Herrn Prof. Dr. med. M. D. Menger danke ich außerdem für die freundliche Aufnahme und die zur Verfügungstellung der Räumlichkeiten und Apparaturen in seinem Institut, in dem die komplette Forschungsarbeit durchgeführt wurde.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie für ihre mir entgegengebrachte herzliche und kompetente Hilfsbereitschaft. Insbesondere Frau C. Marx, Frau Dr. rer. nat. C. Scheuer und Frau J. Becker möchte ich für die Unterstützung bei der Anfertigung der Tumorsuspensionen, der histologischen und der immunhistochemischen Präparate danken. Frau E. Gluding gilt mein Dank für die Pflege der Labortiere.

Publikationen

1. Kollmar O, **Junker B**, Rupertus K, Scheuer C, Menger MD, Schilling MK (2008) Liver resection-associated macrophage inflammatory protein-2 stimulates engraftment but not growth of colorectal metastasis at extrahepatic sites. J Surg Res. 145:295-302
2. Kollmar O, **Junker B**, Rupertus K, Menger MD, Schilling MK (2007) Studies on MIP-2 and CXCR2 expression in a mouse model of extrahepatic colorectal metastasis. Eur J Surg Oncol 33:803-11
3. Rupertus K, Kollmar O, Scheuer C, **Junker B**, Menger MD, Schilling MK (2007) Major but not minor hepatectomy accelerates engraftment of extrahepatic tumor cells. Clin Exp Metastasis 24:39-48
4. Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, **Junker B**, Tilton B, Schilling MK, Menger MD (2007) Stromal cell-derived factor-1 promotes cell migration and tumor growth of colorectal metastasis. Neoplasia 9:862-870.

Publizierte Abstracts

1. **Junker B**, Hild M, Kaymak H, Mester U (2008) Position der natürlichen Linse vor und der Intraokularlinse AcrySof IQ nach Kataraktoperation. Fortschritte der Ophthalmochirurgie 2008; 128
2. Rupertus K, Scheuer C, **Junker B**, Tilton B, Schilling MK, Menger MD, Kollmar O (2008) Blockade of SDF-1 does not affect metastatic tumor growth due to activation of an alternative CXCR-4 - VEGF-dependent pathway after liver resection. Onkologie 2008; 31 Suppl.1:54.
3. Rupertus K, Scheuer C, **Junker B**, Tilton B, Schilling MK, Menger MD, Kollmar O (2008) Die Blockade von SDF-1 nach Leberresektion hat aufgrund eines zusätzlich aktivierten CXCR4/VEGF-abhängigen Signalwegs keinen Einfluss auf das metastatische Tumorwachstum. Chir Forum 2008; Band 37:57-58.
4. Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, **Junker B**, Tilton B, Schilling MK, Menger MD (2008) Stromal cell-derived factor (SDF)-1 promotes cell migration and tumor growth of colorectal metastasis. Onkologie 2008; 31 Suppl.1:56-57.

5. Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, **Junker B**, Tilton B, Schilling MK, Menger MD (2008) Stromal cell-derived factor (SDF)-1 fördert das Wachstum von kolorektalen Metastasen durch Beschleunigung der Angiogenese, Induktion der Tumorzellproliferation und Inhibition der Apoptose. Chir Forum 2008; Band 37:41-42.
6. Kollmar O, **Junker B**, Rupertus K, Scheuer C, Menger MD, Schilling MK (2007) MIP-2 induziert extrahepatisches Wachstum kolorektaler Metastasen über Induktion von Zellproliferation ohne Stimulation der Angiogenese. Chir Forum 2007; Band 36:23.
7. Kollmar O, Rupertus K, **Junker B**, Scheuer C, Menger MD, Schilling MK (2007) MIP-2 induces CXCR2 expression and promotes tumor cell proliferation but not vascularization of established extrahepatic colorectal metastases, whereas liver resection-associated MIP-2 stimulates engraftment but not growth of colorectal metastases at extrahepatic sites. Langenbecks Arch Surg. 2007; 392:811.
8. Rupertus K, Scheuer C, **Junker B**, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O (2007) Erweiterte Leberresektion beschleunigt das Tumorstadium kolorektaler extrahepatischer Metastasen durch gesteigerte Angiogenese und Zellmigration. Chir Forum 2007, Band 36: 131.
9. Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, **Junker B**, Tilton B, Schilling MK, Menger MD (2007) Stromal cell-derived factor (SDF)-1 promotes tumor growth of colorectal metastases by acceleration of angiogenesis, induction of cell proliferation and inhibition of apoptosis. Langenbecks Arch Surg. 2007; 392:804-5.
10. Rupertus K, Scheuer C, Haberl GCY, **Junker B**, Tilton B, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O (2007) Blockade of SDF-1 does not affect metastatic tumor growth due to activation of an alternative, CXCR4-VEGF-dependent pathway after liver resection. Langenbecks Arch Surg. 2007; 392:812.
11. Rupertus K, Kollmar O, Scheuer C, **Junker B**, Dahlem C, Menger MD, Schilling MK(2006) Major but not minor hepatectomy accelerates extrahepatic tumor growth by enhancing cell migration and neovascularization. Langenbecks Arch Surg 2006; 391:534

